KLONIERUNG DER *fhu* GENREGION ZUR EISENVERSORGUNG VON *ESCHERICHIA COLI* K 12

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

LOTHAR FRIEDRICH FECKER

aus Balingen

1983

KLONIERUNG DER fhu GENREGION ZUR EISENVERSORGUNG VON ESCHERICHIA COLI K 12

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

LOTHAR FRIEDRICH FECKER

aus Balingen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung	5. Mai 1983
Dekan	Prof. Dr. K.-P. Hadeler
1. Berichterstatter	Prof. Dr. V. Braun
2. Berichterstatter	Privatdozent Dr. K. Hantke

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. V. Braun und Herrn Privatdozent Dr. K. Hantke am Institut für Biologie II. Lehrstuhl Mikrobiologie II, der Universität Tübingen durchgeführt.

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. V. Braun für die Überlassung des Themas und für die gute Betreuung der Arbeit. Dieser Dank gilt auch für Herrn Privatdozent Dr. K. Hantke.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern von Mikrobiologie I und II, die mir bei der Lösung vieler technischer und organisatorischer Probleme geholfen haben. Insbesondere möchte ich Karin Maschke und Helga Wolff für die Durchführung einiger phototechnischer Arbeiten danken. Außerdem danke ich Dr. Werner Scheuer und Gudrun Schmitz für die Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der ersten Markierungsversuche.

Dr. Knut Heller und Dr. Eckhardt Fischer danke ich für viele Anregungen, die sich in Gesprächen mit Ihnen ergaben.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0023

Inhaltsverzeichnis

		Seite
	Abkürzungen	
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	10
2.1.	Material	10
2.1.1.	Chemikalien	10
2.1.2.	Lösungen	11
2.1.3.	Medien	11
2.1.4.	Bakterienstämme und Bakteriophagen	13
2.1.4.1.	Herkunft und Eigenschaften der Stämme und Bakteriophagen	13
2.1.4.2.	Eigenschaften von Mutanten der Stämme H416, H506, H506 r^-m^-(1) *fepA*1/2, H507 und H508, die als T5 oder Albomycin resistente Abkömmlinge isoliert wurden	14
2.2.	Methoden	16
2.2.1.	Isolierung von Plasmid DNS aus *E. coli* K12	16
2.2.2.	Isolierung von λ DNS aus einem λ CI_{857} lysogenem AB2847 Stamm	17
2.2.3.	Agarosegelelektrophorese	19
2.2.4.	Transformation von E. coli K12 Stämmen und Selektion der Transformanten	21
2.2.5.	T5 und Albomycin Sensitivitätstest – Untersuchung der Fähigkeit zum Wachstum mit Ferrichrom und Rhodothorulasäure	23
2.2.6.	Isolierung der *fhuA*13 Mutante des Stamms H416	24
2.2.7.	Restriktion und Ligation von Plasmid DNS	25
2.2.8.	Doppelspaltungen von Plasmid DNS	27
2.2.9.	Restriktions und Ligationsansätze bei der Suche nach Plasmidvarianten	30
2.2.9.1.	Partielle Spaltung der Tn*5* Insertionsplasmide und Religation	30
2.2.9.2.	Ligation von partiell mit Sal I gespaltener DNS von pFB5/101 und von Sal I gespaltenem pPF3/V1	31

		Seite
2.2.9.3.	Behandlung von pPF3/V1 mit Eco RI* und Religation	31
2.2.9.4.	Inkubation von Xho I linearisiertem pPF3/V1 mit Sau 3a und Ligation	32
2.2.9.5.	Verkleinerung von Plasmiden durch partiellen Verdau und Religation	32
2.2.10.	Isolierung einer r^-m^- Mutante des Stamms H506	33
2.2.11.	Isolierung von H506 r^-m^-(1) fepA1/2	34
2.2.12.	Isolierung von Albomycin resistenten Kolonien von H416 und von H506 r^-m^- (1) fepA1/2	35
2.2.13.	Isolierung von T5 resistenten Mutanten von H506 und H507	35
2.2.14.	Nachweis von Plasmid codierten Proteinen im Minizellsystem	36
2.2.14.1.	Isolierung der Minizellen	36
2.2.14.2.	Markierung der Proteinsynthese der Minizellen	37
2.2.14.3.	Polyacrylamidgelelektrophorese	37
2.2.15.	Nachweis von Plasmid codierten Proteinen mit Hilfe des Maxizellsystems	38
2.2.15.1.	Aufzucht der Zellen und Bestrahlung mit UV-Licht	38
2.2.15.2.	Markierung der synthetisierten Proteine	38
2.2.15.3.	Isolierung der Gesamtmembran und der äußeren Membran	39
2.2.16.	Auftrennung von Gesamtzellprotein oder von Membranprotein durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	40
2.2.17.	Fluorographie	40
3.	Ergebnisse	41
3.1.	Plasmidkonstruktionen	41
3.1.1.	Klonierung der fhuA Genregion in pBR322	41
3.1.2.	Physikalische Karte von pPF3 und pCF1	45
3.1.2.1.	Physikalische Karte von pPF3	45
3.1.2.1.1.	Pst I und Eco RI Schnittstellen	46
3.1.2.1.2.	Bestimmung der Bam HI, Hind III, Cla I und Sal I Schnittstellen	47

		Seite
3.1.2.2.	Physikalische Karte von pCF1	50
3.1.3.	Isolierung von Deletionsplasmiden und Tn5 Insertionsplasmiden	53
3.1.3.1.	Verkleinerung von pPF3 mit Eco RI und von pCF1 mit partiellem Sal I Verdau	54
3.1.3.2.	Tn5 Insertionsplasmide und Verkleinerung von Tn5 Insertionsplasmiden durch Behandlung mit Xho I	56
3.1.3.2.1.	Verkleinerung von Tn5 Insertionsplasmiden mit Xho I	60
3.1.3.2.2.	Integration der Tn5 Insertion von pFB5/101 in das Tetracyclin Resistenzplasmid pPF3/V1	66
3.1.3.3.	Isolierung von Deletionsplasmiden von pPF3/V1	69
3.1.3.3.1.	Plasmidverkleinerung durch Transformation mit linearisierter Plasmid DNS	69
3.1.3.3.2.	Verkleinerung mit Eco RI* Aktivität	70
3.1.3.3.3.	Verkleinerung durch Behandlung von linearisierter DNS mit Sau 3a	72
3.1.3.4.	Plasmidverkleinerung durch Ligation von Sal I oder Pst I behandelter Plasmid DNS	73
3.1.3.4.1.	Verkleinerung von pPF3 mit Sal I	73
3.1.3.4.2.	Verkleinerung von pPF3/V1 und pPF3/V1 del2-15 mit Sal I	76
3.1.3.4.3.	Verkleinerung von pPF3 und pPF3/V1 mit Pst I	78
3.2.	Komplementationsversuche	82
3.2.1.	Isolierung der Albomycin resistenten Mutante von H416	83
3.2.2.	Lokalisierung der Mutationen, die Albomycin Resistenz bewirken	84
3.2.3.	Isolierung der Mutante von H506 r^-m^-(1) fepA1/2	91
3.2.4.	Charakterisierung der Albomycin resistenten Mutanten des Stamms H506 r^-m^-(1) fepA1/2	92
3.3.	Nachweis der Plasmid codierten Proteine	99
3.3.1.	Nachweis der Plasmid codierten Proteine im Minizellen	99

		Seite
3.3.1.1.	Nachweis von Plasmid-codierten Proteinen in Minizellen von H506 fhuA1 Transformanten	100
3.3.1.1.1.	Nachweis des fhuA Genprodukts	100
3.3.1.1.2.	Transkriptionsrichtung von fhuA	103
3.3.1.1.3.	Nachweis von fhuC	104
3.3.1.1.4.	fhuD	105
3.3.1.1.5.	Induktion von fhuA und fhuC	106
3.3.1.2.	Nachweis von Plasmid-codierten Proteinen in Minizellen von H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Ar6	107
3.3.1.2.1.	Nachweis von fhuD	108
3.3.1.2.2.	Suche nach fhuB	109
3.3.1.2.3.	Inaktivierung von fhuC bei pFB500/101	110
3.3.1.3.	Zusammenfassung: Proteine der fhu Region, die im Minizellsystem nachgewiesen wurden	111
3.3.2.	Nachweis der Plasmid-codierten Proteine im Maxizellsystem	113
3.3.2.1.	Membranassoziation von Plasmid-codierten Proteinen	114
4.	Diskussion	117
4.1.	Klonierung der fhuA Region in pBR322	117
4.2.	Lokalisierung von fhuA	118
4.3.	Lokalisierung von fhuC	120
4.4.	Lokalisierung von fhuD	121
4.5.	Lokalisierung von fhuB	123
4.6.	Komplementationsversuche	125
5.	Zusammenfassung	128
6.	Literatur	130
	Anhang : Plasmidkonstruktionen	136

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	deionisiertes Wasser
ATP	Adenosin-5'-triphosphat, Na-salz
Ci	Curie
d, Md	Dalton, Mega-Dalton
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz
g	Erdbeschleunigung
K	Kilo-Dalton
mA	Milli-Ampere
Min.	Minuten
OD_x	optische Dichte bei x nm
PEG	Polyäthylenglycol
pfu	plaque forming units
RE-Ix10	10-fach konzentrierte Inkubationslösung für eine bestimmte Restriktionsendonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunden
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylätylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
W	Watt

1. Einleitung

Das Cytoplasma von Escherichia coli K12 ist wie dasjenige anderer Gram-negativer Bakterien von zwei Membranen mit ähnlicher Zusammensetzung aber mit unterschiedlichen Funktionen (9) umgeben. Zwischen diesen Permeabilitätsbarrieren, der inneren und äußeren Membran, befindet sich im periplasmatischen Raum ein einschichtiger Mureinsacculus (68), der kovalent an das Lipoprotein gebunden ist (8), das seinerseits mit der Fettsäurekomponente mit der äußeren Membran assoziiert ist.

Wie bei anderen Enterobacteriaceae ist das Lipopolysaccharid in der äußeren Membran mit seinen O-spezifischen Zuckerketten, die von der Zelloberfläche in die Umgebung der Zelle ragen, auch bei Escherichia coli Stämmen für die antigenen Eigenschaften verantwortlich (54).

In der inneren Membran, der Cytoplasmamembran, befinden sich neben den Enzymsystemen der Atmungskette, der oxidativen Phosphorilierung und der Biosynthese von Zellwandbestandteilen auch Proteine, die den aktiven Transport von spezifischen Nahrungsbestandteilen des Mediums in die Zelle bewerkstelligen (49). Die Energie für diese oft spezifischen Transportprozesse gegen einen Konzentrationsgradienten liefert das elektrochemische Membranpotential, ATP oder Phospoenolpyruvat.

Die äußere Membran bildet wie die Cytoplasmamembran für makromolekulare hydrophile Substanzen eine Permeabilitätsbarriere. Im Gegensatz zur Cytoplasmamembran kann die äußere Membran von E. coli K12 von hydrophilen Substanzen, die kleiner als ungefähr 600 d sind (53), durch Proteinkanäle hindurch ungehindert passiert werden. Diese von Kationen bevorzugten Kanäle werden von den in der Membran in zahlreichen Kopien vorhandenen Proteine OmpC (Protein Ib) und OmpF (Protein Ia) gebildet. Neben dem weiteren Hauptbestandteil, dem Lipoprotein, kommt in

der äußeren Membran noch ein weiteres Hauptprotein, OmpA, vor, das an der bakteriellen Konjugation beteiligt sein soll (71).

Obwohl die äußere Membran für makromolekulare hydrophile Substanzen eine undurchdringliche Barriere darstellt, kann die DNS von Bakteriophagen nach der Anlagerung der Phagen an einen spezifischen äußeren Membranrezeptor durch die beiden Membrane in das Cytoplasma geschleust werden (14). Genauso gelangen Colicine, nach der Anlagerung an ein spezifisches Rezeptorprotein der äußeren Membran über einen in den Einzelheiten noch unbekannten Translokationsprozeß (14, 43) in die Zelle.

Von einigen dieser Phagen oder Colicin Rezeptorproteine weiß man, daß sie die Aufnahme von bestimmten Nährstoffen aus dem Medium verbessern (15). So erleichtert das λ Rezeptorprotein LamB in der äußeren Membran die Aufnahme von Maltose und Maltodextinen (73, 74) und das Tsx Protein, das auch als T6 und Colicin K Rezeptorprotein in der äußeren Membran fungiert, verursacht einen besseren Transport von Nukleosiden und Desoxynukleosiden in die Zelle (32, 44). Eine größere Bedeutung haben die Rezeptorproteine jedoch bei der Aufnahme von Eisen(III) mit Hilfe von Enterochelin, Citrat, Ferrichrom und Aerobactin und bei der Aufnahme von Vitamin B12.

Die Aufnahme von Vitamin B12 in die Zelle erfolgt nur, wenn das BtuB Protein in der äußeren Membran enthalten ist (25). Dieses Protein stellt jedoch nicht nur das Vitamin B12 Rezeptorprotein dar, sondern es dient auch als Rezeptor für den Phagen BF23 und für die Colicine E1, E2 und E3. Für den Transport des Vitamin B12-Kobalt Komplexes durch die Cytoplasmamembran wurde die Beteiligung des btuC Genprodukts nachgewiesen (62).

Die Aufnahme von Eisen bei aeroben Wachstumsbedingungen ist für einen Organismus wie E. coli problematisch. Un-

ter aeroben Bedingungen liegt Eisen in der Natur bei pH 7 als dreiwertig positiv geladenes Kation vor und zwar fest gebunden in einem Ferri-Hydroxy-Aquo Komplex. Die Konzentration an freien Eisen(III)-Kationen beträgt dabei 10^{-12} µM bei pH 7. Mikroorganismen wie E. coli benötigen zum Wachstum aber Konzentrationen von etwa 0,1 µM Fe(III) (11). Die Eisenversorgung von E. coli ist unter diesen Bedingungen nur dadurch gewährleistet, daß die Zellen bei Eisenmangel den hochaffinen Eisenkomplexbildner Enterochelin synthetisieren und ins Medium ausscheiden, der mit Fe(III) beladen über das ColicinB Rezeptorprotein FepA (Molekulargewicht 81 K) in der äußeren Membran (65) und vermutlich über FepB in der Cytoplasmamembran (83) der Zelle zugeführt wird. Andererseits kann auch ein im Medium vorkommender, von anderen Organismen ausgeschiedener Eisenkomplexbildner wie Citrat, Ferrichrom oder Rhodothorulasäure für die Eisenversorgung benutzt werden. Außerdem wurde vor kurzem bei pathogenen E. coli Stämmen neben Enterochelin noch zusätzlich der von diesen Zellen selbst synthetisierte Hydroxamsäuresiderophor Aerobactin nachgewiesen (10, 79). Dieses Eisenaufnahmesystem konnte dem Plasmid ColV, einem Plasmid das Pathogenität verursacht, zugeordnet werden (82).

Das Protein FecA in der äußeren Membran von E. coli K12, das in Abhängigkeit von Citrat im Medium induziert wird, ist als Rezeptorprotein an der hochaffinen Aufnahme von Citrat komplexiertem Fe(III) aus dem Medium beteiligt (30, 78). Auch hier konnte in der Nähe vom fecA Lokus auf dem Bakterienchromosom ein Genbereich fecB nachgewiesen werden, der für ein Protein der Cytoplasmamembran codieren soll, das an der Aufnahme von Eisen(III) mittels Citrat beteiligt ist (78).

Die Aufnahme von Eisen(III) mit dem Hydroxamsäuresiderophor Ferrichrom, ein Eisenkomplexbildner, der von dem Pilz Ustilago sphaerogena ausgeschieden wird (52), er-

folgt mit Beteiligung des Rezeptorproteins FhuA in der äußeren Membran (36). Es wurde gezeigt, daß in der Cytoplasmamembran die Freisetzung von Eisen(III) aus dem Ferrichromkomplex unter Reduktion zu Eisen(II) erfolgt. Außerdem gibt es in dieser Membranfraktion ein Enzymsystem, das Desferriferrichrom durch Azetylierung modifiziert (39, 70). Das modifizierte Desferriferrichrom gelangt dann wieder ins Medium.

Das Ferrichrom Rezeptorprotein mit einem Molekulargewicht von 78 K wird vom Gen fhuA codiert, das bei 3,5 Min. auf der E. coli K12 Genkarte liegt (2). FhuA ist auch das Rezeptorprotein von Colicin M und der Bakteriophagen T1, ϕ80 und T5 (17, 18, 80). Neben der Aufnahme von Eisen(III) komplexiert in Ferrichrom ist FhuA auch für die Aufnahme des Sideromycins Albomycin notwendig (36). Albomycin, das von einem Actinomycetenstamm ausgeschieden wird, besitzt eine ähnliche chemische Strukturformel wie Ferrichrom (3a). Beide Verbindungen besitzen drei Hydroxamsäuregruppierungen, die an der Komplexierung der dreiwertigen Eisenkationen beteiligt sind. Albomycin hat dagegen noch eine antibiotisch wirksame Gruppierung, die in der Zelle hydrolytisch vom Peptidträgermolekül abgespalten wird und dann in der Zelle seine antibiotische Wirkung entfaltet (40). Das Spaltprodukt mit den Hydroxamsäuregruppierungen wird dagegen wieder ins Medium ausgeschieden.

Bei der Untersuchung von Mutanten, die auf Grund ihrer Albomycin Resistenz selektioniert wurden, fand man bei dem aroB Stamm AB2847 T5, ϕ80 und Colicin M sensitive Mutanten, die nicht mehr mit Ferrichrom wachsen konnten (16). Die Mutationen die auf Grund der Phagen und Colicin M Sensitivität der Mutanten nicht fhuA betrafen, konnten mit dem fhuA benachbarten Gen dapD kotransduziert werden. Es wurde angenommen, daß neben fhuA noch Gene lagen, die für die Aufnahme von Ferrichrom und

Albomycin notwendig waren. Spätere Ergebnisse von Versuchen, bei denen solche Mutanten mit dem Enzym Pronase behandelt wurden, das die äußere Membran permeabel für Ferrichrom machte, zeigten, daß die Gene neben fhuA wahrscheinlich für eine Aufnahmekomponente in der Cytoplasmamembran codierten, denn diese Pronase behandelten Mutanten transportierten Eisen(III) mittels Ferrichrom nicht mehr in die Zelle (11, 83a)

Bei späteren Untersuchungen des fhuA Genbereichs von E. coli K12 mit Hilfe von Transduktionsexperimenten und Komplementationsversuchen (41) wurde neben fhuA das Gen fhuB nachgewiesen, das genauso wie fhuA für das Wachstum mit Ferrichrom notwendig war. Außerdem wurde zwischen fhuA und fhuB ein Gen fhuC vermutet, das für die Wachstumsförderung mit Rhodothorulasäure als Eisen(III)-Komplexverbindung (52) erforderlich sein sollte. Rhodothorulasäure benutzt als Rezeptor der äußeren Membran jedoch nicht fhuA sondern nach neuesten Ergebnissen wie Coprogen das 76 K Protein, das von fhuE codiert wird (35). Die Genreihenfolge der fhuA Region, die sich aus den Ergebnissen der Transduktionsexperimente ergab, lautete: 0 Min. - 3 Min. - pan - mrcB - fhuA - fhuB - dapD (Gensymbole außer fhuA (= tonA) und fhuB nach Bachmann und Low, 2). Auch hier wurde das fhuB Genprodukt der Cytoplasmamembran zugeordnet, wo es die Aufnahme von Eisen(III) gebunden an Ferrichrom oder Albomycin in die Zelle vermitteln sollte.

Die fhuA benachbarten Gene sind, neben der Aufnahme der von E. coli K12 nicht selbst synthetisierten Eisenkomplexbildner wie zum Beispiel Ferrichrom und Rhodothorulasäure auch für die Aufnahme des Hydroxamsäuresiderophors Aerobactin notwendig, der von einigen pathogenen E. coli Stämmen ins Medium ausgeschieden wird (12, 13). Als Rezeptor für Aerobactin dient jedoch das von Col V codierte Cloacin Rezeptorprotein (iut Genprodukt)

in der äußeren Membran.

Die hochaffinen Systeme für die Aufnahme von Eisen(III) aus dem Medium mit Hilfe von Enterochelin, Citrat, Ferrichrom oder Aerobactin werden alle unter anaeroben Bedingungen, wo Eisen in Form von Fe(II) der Zelle leichter zugänglich ist, reprimiert. Bei aeroben und anaeroben Bedingungen erfolgt bei besonderen Eisenmangelbedingungen, zum Beispiel wenn Dipyridyl dem Medium zugesetzt wird, eine Induktion der Expression der Gene, die für die Eisenaufnahme notwendig sind (33). Es konnte eine fur Mutante isoliert werden (33), welche die Proteine FhuA, (FecA), FepA, Iut und die durch Eisenmangel zusätzlich induzierbaren Proteine Cir, 76 K (FhuE) und 83 K in der äußeren Membran auch bei guter Eisenversorgung der Zellen konstitutiv überproduzierte. Diese fur Mutation zeigt, daß die Gene dieser verschiedenen Eisenaufnahmesysteme einer gemeinsamen Regulation unterliegen (Abb. 1, b)

Für alle hier aufgeführten hochspezifischen Rezeptor abhängigen Aufnahmesysteme von Vitamin B12 und Eisen(III), für die jeweils die Rezeptorkomponente in der äußeren Membran nachgewiesen und die Komponente in der Cytoplasmamembran postuliert wurde (Abb. 1, a), ist noch zusätzlich das tonB Genprodukt notwendig, das die Rezeptoraktivität in Abhängigkeit des energetischen Zustands der Zelle modulieren soll (37). Außerdem ist das tonB Gen auch für die Wirkung von Colicin B, M und Ia auf die Zelle und für die Infektion von E. coli K12 mit den Phagen T1 und ϕ80 notwendig. Für einige der besprochenen Aufnahmeprozeße konnte auch die Beteiligung von exbB und exbC gezeigt werden (38, 59).

In dieser Arbeit wurde die fhu Region von E. coli K12, besonders der fhuA benachbarte Genbereich in Richtung der Gene popC und dapD (2) mit Hilfe des Plasmids pLC4-43 der Clark und Carbon Genbank untersucht (20, 21).

pLC4-43 enthält wie pLC19-19, integriert in ColE1 DNS, ein chromosomales DNS Fragment, das neben dem Gen für das Penicillin Bindeprotein 1B mrcB (2) bei 3,2 Min. der E. coli Genkarte, auch das Gen fhuA (tonA) beinhaltet (75). Anders als bei pLC19-19 ist in dem chromosomalen DNS Fragment von pLC4-43 die fhuA benachbarte Region, in der die Gene fhuC und fhuB vermutet werden, enthalten (26). Wahrscheinlich enthält das Plasmid pLC4-43 neben fhuB auch das benachbarte Gen popC (2). Das Gen dapD bei 3,7 Min. konnte jedoch auf pLC4-43 nicht mehr nachgewiesen werden. Die dapD Region wurde bereits kloniert und physikalisch kartiert (3).

Ausgehend von pLC4-43 wurde die fhuA Genregion in den "multi copy" Vektor pBR322 (7, Abb. 2) kloniert. Die Untersuchung der in pBR322 integrierten DNS Region der Hybridplasmide erfolgte dann durch Restriktionsanalyse, Isolierung von Deletionsplasmiden und Isolierung von Plasmiden mit Insertionen des Transposons Tn5 (4, 27, 66, Abb. 3). Mit diesen Plasmiden wurden auch zwei neben dem fhuA Gen codierten Proteine im Minizellsystem (64) und im Maxizellsystem (67) nachgewiesen.

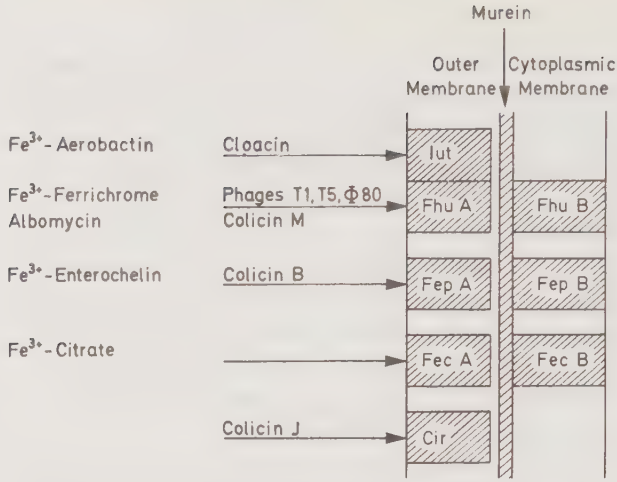


Abb. 1,a: Lokalisierung der bekannten Membran gebundenen Genprodukte der hochaffinen Eisen(III)-Transportsysteme von E. coli K12 in der äußeren Membran (Outer Membrane) und in der inneren Membran (Cytoplasmic Membrane). Cir bezeichnet ein durch Eisenmangel neben den übrigen Proteinen zusätzlich induzierbares äußeres Membranprotein.

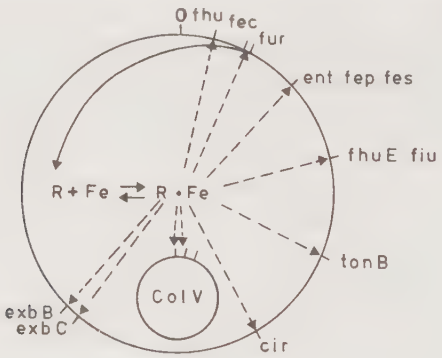


Abb 1,b: Gene des E. coli K12 Chromosoms und des Plasmids ColV , die von dem fur Genprodukt (R) in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration in der Zelle reguliert werden. Bei guter Eisenversorgung erfolgt die Regulation durch Repression durch den RxFe Komplex auf der Ebene der Transkription.

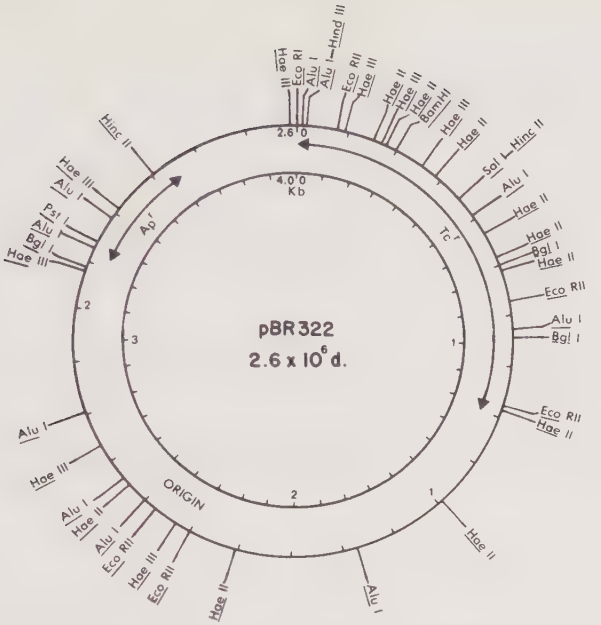


Abb. 2: Restriktionskarte von pBR322. Im äußeren Kreis sind die Schnittstellen verschiedener DNS Restriktionsenzyme angegeben. Der äußere Kreis ist in etwa 26 Einheiten unterteilt, von denen jede einem Molekulargewicht von 10^6 d entspricht. Der innere Kreis ist in 40 Einheiten unterteilt – jede Einheit entspricht hier 100 Basenpaaren. Die Genregion, die für Ampicillin (Ap^r) und Tetracyclin Resistenz (Tc^r) codiert, ist jeweils innerhalb des äußeren Kreises mit Pfeilen versehen. Origin bezeichnet den Anfangspunkt der DNS Replikation von pBR322.

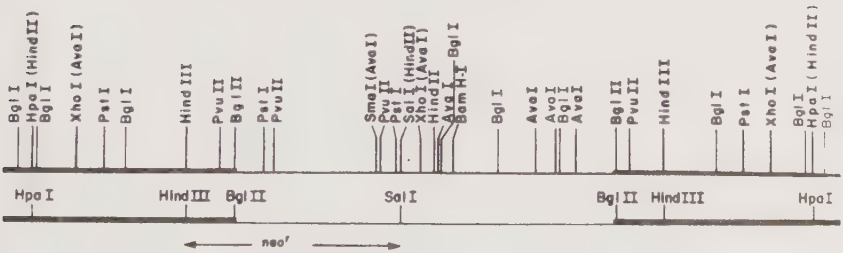


Abb. 3: Restriktionskarte des Transposons Tn5. Die Region, die notwendig für die Neomycin Resistenz (neo^r) ist, liegt zwischen der Hind III Schnittstelle in dem linken komplementären Ende und der Sal I Schnittstelle in der mittleren Region von Tn5. Die dick gezeichneten Linien kennzeichnen die gegenläufig komplementären Enden von Tn5.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten verwendeten Chemikalien waren analysenreine Reagenzien der Firma E. Merck, Darmstadt.

Amersham Buchler:	^{14}C-Aminosäurengemisch
Boehringer:	ATP-Dinatriumsalz Neomycin Restriktionsendonukleasen: Bam HI, Cla I, Eco RI, Hind III, Pst I, Sal I T4-DNS Ligase
BRL:	Restriktionsendonuklease Xho I
Difco:	Bacto Agar Bacto Trypton Nutrient Broth Yeast Extract
Miles:	HGT Agarose
NEN:	Enhance
Serva:	Acrylamid N,N'-Methylenbisacrylamid Ammoniumpersulfat Bromphenolblau, Na-salz Chloramphenicol 2-Mercaptoäthanol Polyäthylenglycol 6000 SDS TEMED Triton X-100
Sigma:	Ampicillin

Sigma: Ethidiumbromid
Lysozym
Rinderpankreas DNase 1
Tetracyclin

Die Restriktionsendonuklease Sau 3a war mir von Dr. Renz vom Max Planck Institut für Biologie in Tübingen zur Verfügung gestellt worden.

Ferrichrom, Albomycin und Rhodothorulasäure wurden von Prof. Dr. Zähner, Dr. Fiedler und Dr. Hasenböhler zur Verfügung gestellt.

Das Colicin B Präparat stammte von Privatdozent Dr. Hantke.

2.1.2. Lösungen

Lösungen für die Isolierung von Plasmid DNS (2.2.1.):

TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8

Sacharoselösung: 25 % Sacharose in 50 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA

Triton Lysis Mix: 1 ml Triton X-100
25 ml 0,25 M EDTA
5 ml 1 M Tris-HCl, pH 8
63 ml Aqua dest.

wässeriges Phenol: 100 g Phenol und 139 mg Hydroxychinolin in 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5

2.1.3. Medien

TY: 10 g Bacto Trypton, 5 g Yeast Extract, 5 g NaCl wurden mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.

TY-Agarplatten: In einem Liter TY waren zusätzlich noch 15 g Bacto Agar enthalten.

TY-Weichagar: In einem Liter TY waren zusätzlich noch 7 g Bacto Agar enthalten.

TY-Medium und TY-Agarplatten mit Antibiotika enthielten zusätzlich 20 mg/l Ampicillin, 7 mg/l Tetracyclin oder 100 mg/l Neomycin (bei der Selektion von Transformanten mit Tn*5* Insertionsplasmiden).

NB-Agarplatten: 8 g Nutrient Broth, 5 g NaCl und 15 g Bacto Agar mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.

Lamda-ym: 10 g Bacto Trypton, 2,5 g NaCl in 1 l Aqua dest.; zusätzlich 0,2 % Maltose und 0,01 % Yeast Extract.

M9-Puffer: 6 g Na_2HPO_4, 3 g KH_2PO_4, 0,5 g NaCl und 1 g NH_4Cl in 1 l Aqua dest. gelöst, pH 7,3.

M9-Medium: 1000 ml M9 Puffer, 10, 15 oder 20 ml 20 % Glucose, 1 ml 1 M $MgSO_4$ und 1 ml 0,1 M $CaCl_2$.

M9-Medien mit Antibiotika: 20 mg Ampicillin oder 7 mg Tetracyclin pro Liter Medium.

2.1.4. Bakterienstämme und Bakteriophagen

2.1.4.1. Herkunft und Eigenschaften der Stämme und Bakteriophagen

Stamm	wichtige genetische Eigenschaften	Herkunft
HB101	recA, su⁻, leu, pro, r^-m^-	Hohn, B.[1] Collins, J.
H416	wie HB101, zusätzlich aro	Mikro II[2]
H506	minA, minB, recA, lacY, xyl, thi, S^m, r^+m^+	Mikro II[2]
H506 r^-m^-(1) fepA1/2	wie H506, zusätzlich r^-m^- und Resistenz gegenüber Colicin B	diese Arbeit (3.2.3.)
H507	recA, uvrA, r^+m^+	Mikro II[2]
H508	hsdR (r^-m^+), recA, met::Tn5	Mikro II[2]
AB2847/λCI_{857}	aroB, thi, fhuA24, λCI_{857} lysogen	Mikro II (26)
H562/ λCI_{ts}::TN10	r^-m^-, λCI_{ts}::Tn10 lysogen	Mikro II[2]
λ vir	virulenter Phage von λwt	Mikro II
T5st.	temperaturstabiler Abkömmling von T5	Mikro II

Erläuterungen: 1) Hohn, B., Collins, J., Gesellschaft für biotechnologische Forschung, Mascheroder Weg, Braunschweig-Stöckheim.
2) Stamm-Nr. der Stammsammlung Mikrobiologie II, Universität Tübingen.

2.1.4.2. Eigenschaften von Mutanten der Stämme H416, H506, H506 r⁻m⁻(1) fepA1/2, H507 und H508, die als T5 oder Albomycin resistente Abkömmlinge isoliert wurden

Stamm	Bezeichnung der Mutante	Selektion Resistenz gegenüber	Genotyp[6]	Phänotyp Sensitivität gegenüber T5	Albomycin	Wachstum mit Ferri-chrom	Rhodo-thorula-säure	Albo-mycin	Beschreibung
H506	fhuA1	T5	fhuA[3]	-	-	n.b.	n.b.	n.b.	3.3.1.
H507	fhuA1	T5	fhuA[3]	-	-	n.b.	n.b.	n.b.	3.3.2.
H508	fhuA	T5	fhuA	-	-	n.b.	n.b.	n.b.	3.1.3.2.1.
H416	fhuA13	T5	fhuA, fhuC fhuD, fhuB	-	-	-	-	-	3.1.1., 3.1.3. 3.1.3.2.1.
H416	Ar2/2	Albomycin	pepN[1]	+	-	++	+	+	3.2.2.
H416	Ar4/1 und Ar4'/4	Albomycin	fhuA[2]	+	-	+	-	n.b.	3.2.2.
H416	Ar4/2, ArIV/1 ArVI/2 und ArVII/2	Albomycin	fhuB	+	-	-	-	n.b.	3.2.2.
H416	Ar4'/2	Albomycin	fhuD, fhuB	+	-	-	-	n.b.	3.2.2.
H416	ArIII/2, ArIX/1	Albomycin	fhuA[2]	-	-	-	-	n.b.	3.2.2.
H506 r⁻m⁻(1) fepA1/2	Ar1, Ar14, (Ar16)[4]	Albomycin	fhuA[2]	-	-	-	-	-	3.2.4.

Fortsetzung der Tabelle:

Stamm	Bezeichnung der Mutante	Selektion Resistenz gegenüber	Genotyp[6]	Phänotyp Sensitivität gegenüber T5	Albomycin	Wachstum mit Ferrichrom	Rhodothrulasäure	Albomycin	Beschreibung
H506 r⁻m⁻(1) fepA1/2	Ar3	Albomycin	fhuA[3]	+o	-	-	-	-	3.2.4.
H506 r⁻m⁻(1) fepA1/2	Ar2, Ar5, Ar11, (Ar4, und Ar9)[4]	Albomycin		+	-	+	+o	+o	3.2.4.
"	Ar8, Ar13, Ar15, (Ar7)	Albomycin	fhuA[5]	+	-	+o	-	-	3.2.4.
"	Ar6, Ar10	Albomycin	fhuB	-	-	-	-	-	3.2.4.
"	Ar12	Albomycin	fhuC	-	-	-	-	-	3.2.4.

Erläuterungen: Sensitivitätstest (2.2.5.): + bedeutet Sensitivität; -, Resistenz; +o, nicht vollständige Sensitivität.
Wachstumstest (2.2.5.): ++, +, +o, -: ++ bis -, abnehmende Intensität der Wachstumsförderungszone um die betreffende Filterrondelle.

1) Persönliche Mitteilung von Prof. Dr. V. Braun
2) Die fhuA Mutation wirkt sich polar auf die Expression von fhuC, fhuD und fhuB aus.
3) Polarer Effekt der fhuA Mutation wie bei 2) vermutet.
4) In Klammer: Mutanten, die durch Komplementationsstudien nicht untersucht wurden, die aber wegen ihren Eigenschaften hier einzuordnen sind.
5) Die Mutanten zeichnen sich durch schwaches Backgroundwachstum auf den Dipyridyltestplatten aus.
6) Genotyp nach den Ergebnissen der Komplementationsuntersuchung

2.2. Methoden

2.2.1. Isolierung von Plasmid DNS aus E. coli K12

Plasmid DNS, die durch Behandlung mit Restriktionsenzymen analysiert, und die nicht bei Ligationen eingesetzt werden sollte , wurde nach der Schnellmethode nach Birnboim und Doly (5) isoliert. Die Isolierung erfolgte nach der Vorschrift, jedoch wurde die RNAse Behandlung der gereinigten DNS Proben weggelassen.

Plasmid DNS mit höherem Reinheitsgrad für Ligationen bekam man nach folgender Versuchsdurchführung:

1 l TY-Medium mit dem ensprechenden Antibiotikum (20 µg/ml Ampicillin für pCF1 Abkömmlinge und 7 µg/ml Tetracyclin für pPF3 Abkömmlinge) wurde mit dem Plasmid-haltigen Stamm angeimpft und im Schüttelbad bei 37°C bis zu einer OD_{578} von 1 inkubiert. Bei dieser Zelldichte gab man 1 µg zu 1 ml Kulturflüssigkeit Chloramphenicol zu und inkubierte über Nacht weiter.

Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 Min. mit 7000 x g geerntet. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment in 30 ml kaltem TE (2.1.2.) aufgenommen. Die Zentrifugation wurde nocheinmal wiederholt und die Zellen in 10 ml kalter Saccharoselösung (25 %) aufgenommen. Es wurden 2 ml Lysozymlösung (5 mg/ml) und 4 ml 0,25 M EDTA (pH 8) zugegeben und das Gemisch für 5 - 10 Min. auf Eis gestellt. Die Lösung wurde dann mit 13 000 x g bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde einmal mit wässerigem Phenol (2.1.2.) und 2 x mit Chloroform / Isoamylalkohol (24 : 1) extrahiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen einer 2,5 M Natriumacetatlösung und von 2 Volumen Äthylalkohol die DNS bei -20°C über Nacht gefällt.

Nach der Fällung wurde die DNS mit 7 000 x g für 45 Min. bei -20°C abzentrifugiert, im Exsikator getrocknet und in 22 ml TE aufgenommen. Pro ml dieser Lösung wurde 1 g CsCl und zu der Gesamtmenge 3,11 ml einer Ethidiumbromidlösung

(10 mg/ml) zugegeben. Dieses Gemisch wurde in Zentrifugenröhrchen für den 75 Ti Rotor der Beckmann Ultrazentrifuge aufgeteilt und 40 Std. lang mit 50 000 UpM bei 20°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Röhrchen im UV-Durchlicht betrachtet. Von den beiden sichtbaren DNS Banden wurde die untere Bande, die die "supercoiled" DNS enthielt (61), mit der Spritze isoliert. Diese DNS-haltige Fraktion wurde 4x mit dem gleichen Volumen Isopropylalkohol, equilibriert mit CsCl gesättigtem TE Puffer, extrahiert, um das Ethidiumbromid zu entfernen und danach gegen TE bei 4°C dialysiert. Dabei wurde innerhalb 36 Std. der TE Puffer 3x gewechselt. Nach der Dialyse wurde die Konzentration der DNS durch Messen der optischen Dichte bei 260 nm mit Hilfe des Photometers bestimmt (eine OD_{260} von 20 entspricht etwa einer DNS Konzentration von 1 mg/ml). In der Regel lag bei den einzelnen Plasmidisolierungen die DNS Konzentration zwischen 0,08 und 0,2 mg/ml. Diese DNS Konzentrationen waren für die Restriktionsversuche und Ligationen hoch genug, sodaß eine nochmalige Konzentrierung der DNS durch Fällung nicht notwendig war.

Die Auftrennungen der so isolierten Plasmid DNS im Agarosegel (0,6% - 0,7%) zeigten, daß die Plasmid DNS hauptsächlich in der "supercoiled" Form vorlag, und daß im UV-Durchlicht keine durch Ethidiumbromid sichtbar werdende niedermolekulare RNS vorlag.

2.2.2. Isolierung von λ DNS aus einem λ CI_{857} lysogenem AB2847 Stamm

Zweimal 1 l TY-Medium, das $MgSO_4$ enthielt (1 mM), in 2 x 2 l Schikanekolben wurden mit je 5 ml einer Übernachtkultur von AB2847/λ CI_{857} angeimpft und bei 28°C bis zu einer OD_{578} von 0,4 geschüttelt. Die Induktion der Prophagen erfolgte durch Schütteln der Kulturen für 30 Min. im 43°C Wasserbad. Danach inkubierte man die Zellen für 3 Std. im 37°C Schüttelbad. Zu jeder Zellkultur wurde danach 1 ml Chloroform gegeben. Nach 10 Min.

Stehen bei Zimmertemperatur zentrifugierte man die Kulturen bei 4 °C mit 11 000 x g 10 Min. lang ab. Die Kulturüberstände wurden vereinigt und mit PEG 6 000 und NaCl versetzt (42), so daß eine 10% PEG 6000 und 3% NaCl Lösung resultierte. Diese Kulturflüssigkeit wurde über Nacht bei 4 °C aufbewahrt.

Am anderen Morgen wurde das phagenhaltige, sedimentierte Material für 15 Min. mit 4 500 x g abzentrifugiert und in 20 ml Phagenpuffer (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 10 mM $MgCl_2$) resuspendiert. Die Suspension inkubierte man mit einigen Kristallen Rinderpankreas DNase für 10 Min. bei 37 °C. Anschließend lagerte man jeweils 5 ml der Suspension einem CsCl-Gradienten folgender Zusammensetzung auf: 1,7 g/cm^3, 1,6 g/cm^3, 1,52 g/cm^3, 1,45 g/cm^3, 1,4 g/cm^3, 1,25 g/cm^3 (angegeben sind die Dichten der CsCl Lösungen). Bei der Herstellung dieser CsCl Lösungen ging man von einer Stammlösung der Dichte 2 g/cm^3 aus. Dies entspricht einer Lösung von 100 g CsCl in 53,85 g Phagenpuffer.

Die vier Proben wurden dann für 17 Std. mit 70 000 x g bei 20 °C in der Beckmann Ultrazentrifuge zentrifugiert (Rotor SW 40 Ti, 23 000 UpM). Nach der Zentrifugation wurden die dünnen opaleszierenden Phagenbanden mit Hilfe einer Spritze isoliert und in Dialyseschläuche überführt. Die Dialyse erfolgte für 60 Std. bei 4 °C gegen den Phagenpuffer.

Die dialysierte Phagensuspension wurde 2 mal mit dem gleichen Volumen an wassergesättigtem Phenol extrahiert. Der λ DNS haltige Überstand nach der zweiten Phenolextraktion wurde mit dem doppelten Volumen an kaltem Äthanol versetzt und in der Kälte geschüttelt, sodaß die λ DNS ausfiel. Dieses Fällungsgemisch wurde für 15 Min. bei 4 °C mit 4 000 x g abzentrifugiert. Man verwarf den Überstand und löste die sedimentierte Substanz, unter anderem auch die λ DNS. in jeweils 0,5 ml TE Puffer. Diese DNS Lösung wur-

de dann für 24 Std. bei 4 °C gegen TE Puffer dialysiert. Schließlich bestimmte man die DNS Konzentration der λ DNS photometrisch (2.2.1.).

Die Fragmente des Hind III beziehungsweise Eco RI Verdaus der λ DNS dienten als Molekulargewichtsstandart für die Bestimmung der unbekannten Größen von anderen Restriktionsfragmenten. Die λ-Hind III Fragmente besitzen Molekulargewichte von 15,58 Md, 6,36 Md, 4,38 Md, 2,86 Md, 1,49 Md, 1,31 Md, 0,37 Md und 0,23 Md (55), während die Eco RI Fragmente Molekulargewichte von 14,42 Md, 4,96 Md, 3,85 Md, 3,72 Md, 3,20 Md und 2,30 Md haben (55). Die arithmetische Auftragung der Werte der Wanderungsstrecken der λ-Fragmente an der Abszisse und die logarithmische Auftragung der Molekulargewichte dieser Fragmente an der Ordinate, ergab die Eichkurve für die Bestimmunug der Größen anderer DNS Fragmente (1).

2.2.3. Agarosegelelektrophorese

Die Analyse der Größe von isolierten Plasmiden (2.2.1.) erfolgte durch die elektrophoretische Auftrennung der zirkulären Plasmid DNS in Agarosegelen (0,6% bis 0,7%). Mit Hilfe dieser Gele wurden auch die Molekulargewichte von linearen Plasmidfragmenten bestimmt, die nach der Einwirkung einer DNS Restriktionsendonuklease entstanden waren.

Die Agarosegelelektrophorese erfolgte entweder mit Hilfe der wassergekühlten vertikalen Elektrophoresevorrichtung von Höfer Scientific Instruments, San Francisco, USA oder mit der horizontalen Agarosegelapparatur von Bethesta Research Laboratories, Inc. (Serie 1025, Modell H4). Bei der vertikalen Elektrophoresevorrichtung wurde das Agarosegel zwischen zwei Glasplatten der Größe 17,6 cm x 14 cm gegossen, die von Spacern von 3 mm Breite getrennt waren. Um zu verhindern, daß das Agarosegel durchrutschen konnte, wurde zwischen die beiden Platten zu-

nächst ein 1 cm breites Acrylamidgel (11% Gew./Vol. Acrylamid; 0,2% Gew./Vol. Bisacrylamid) mit der Ionenzusammensetzung des Elektrophoresepuffers gegossen. Der Elektrophoresepuffer war 36 mM an Tris, 30 mM an NaH_2PO_4, 1 mM an EDTA und hatte einen pH von 7,5.

Zur Herstellung eines Agarosegels (0,7%) wurden 0,56 g HGT Agarose in 40 ml Aqua dest. autoklaviert. Nach dem Autoklavieren gab man 40 ml eines doppelt konzentrierten Elektrophoresepuffers zu und rührte 30 Min. mit Hilfe eines Magnetrührers, so daß eine homogene Verteilung der Agarose in der Lösung erfolgte. Der Elektrophoresekamm wurde zwischen die Glasplatten geschoben und die etwa 70 °C heiße Agarose wurde dann schnell auf das polymerisierte Acrylamidgel gegossen. Man füllte die obere Elektrophoresekammer mit Puffer und ließ das Gel fest werden. Danach wurde der Elektrophoresekamm langsam aus dem Gel herausgezogen. Die unter Elektrophoresekammer wurde mit 1,3 l Puffer gefüllt und die DNS Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte für 4 Std. mit 40 - 50 mA.

Bei der horizontalen Elektrophoreseapparatur wurde das etwa 60 °C heiße flüssige Gel (300 ml, 0,6% bis o,7% Agarose in Elektrophoresepuffer) auf einen Gelträger aus Plexiglas mit 20 x 24,5 cm gegossen, der an den beiden offenen Seiten mit Klebestreifen wannenartig geschlossen war. In das noch flüssige Gel wurde anschließend sofort ein Teflonkamm an der dafür vorgesehenen Stelle quer so eingetaucht, daß er nicht den Boden der Plexiglaswanne berührte. Nach einer Stunde war das Agarosegel fest. Der Kamm wurde aus dem Gel herausgenommen, nachdem der Gelträger in die Elektrophoresekammer gesetzt und mit Elektrophoresepuffer überschwemmt worden war. Als Elektrophoresepuffer verwendete man hier eine 10 mM Tris, 1mM EDTA Lösung, die mit Eisessig auf den pH von 7,9 eingestellt wurde. Die Elektrophorese der DNS Proben erfolgte wie oben beschrieben.

Vor dem Auftragen von zirkulären oder mit einem Restriktionsenzym fragmentierten Plasmid DNS Proben wurde zu den Proben ein Drittel Volumen Stopmix (4 M Harnstoff, 50% Gew./Vol. Sacharose, 50 mM EDTA und o,1% Gew./Vol. Bromphenolblau)zugegeben. Durch 10 Min. langes Erhitzen der Restriktionsproben mit oder ohne Stopmix bei 70 °C wurde nach der Behandlung der Plasmid DNS mit einer Restriktionsendonuklease der enzymatische DNS Spaltungsprozeß beendet.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNS wurde das Agarosegel in Gelpuffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gelegt. Auf Grund der Einlagerung des Ethidiumbromids zwischen die Basenpaare der DNS (61) konnten die DNS Banden im UV-Durchlicht eines UV-Transilluminators der Firma Ultra Violet Products Inc.,San Gabriel, USA sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Polaroid Land Kamera photographiert werden (Verwendung eines UV-Filters und eines Rotfilters). Anhand der Photographien der Agarosegele konnten die Wanderungsstrecken der Restriktionsfragmente der Plasmide bestimmt werden, mit denen dann anhand der Eichkurven (2.2.2.) der λ-Hind III und λ-Eco RI Fragmente die entsprechenden Molekulargewichte bestimmt werden konnten.

2.2.4. Transformation von *E. coli* K12 Stämmen und Selektion der Transformanten

Transformationen wurden sowohl mit Plasmid DNS Proben aus dem r^-m^- Stamm HB101, der die DNS nicht mehr K12 spezifisch modifiziert (31), durchgeführt als auch mit Plasmid DNS aus H508 (r^-m^+), H507 (r^+m^+) und H506 (r^+m^+). Auf Grund der Restriktion nicht K12 spezifisch modifizierter DNS in H506 (r^+m^+) und H507 (r^+m^+) Zellen mußte darauf geachtet werden, daß Plasmid DNS nicht direkt von HB101 (r^-m^-) in den Stamm H506 (r^+m^+) transformiert wurde. Die Plasmid DNS aus HB101 konnte nur nach einer Passage über H508 (r^-m^+) erfolgreich in den Stamm H506 (r^+m^+) transformiert werden.

Die Durchführung der Transformationen erfolgte wie in der Literatur beschrieben (24). Zur Selektion der Transformanten wurden in der Regel 0,1 ml der Transformantensuspension nach der letzten Inkubation bei 37 °C auf TY-Agarplatten mit Ampicillin (20 µg/ml), bei Transformationen mit pCF1 Abkömmlingen, oder auf TY-Agarplatten mit Tetracyclin (7 µg/ml), bei Transformationen mit pPF3 Abkömmlingen, ausplattiert. Wenn die Transformation von vorne herein eine niedrige Anzahl von Transformanten erwarten ließ, zum Beispiel bei Transformationen mit religierter, Restriktionsendonuklease behandelter Plasmid DNS (3.1.3.1., 3.1.3.2.2., 3.1.3.2.3.) oder bei Transformationen mit linearisierter Plasmid DNS (3.1.3.3.1.) wurden auch 0,1 bis 0,2 ml der 10-fach konzentrierten Transformantensuspensionen auf den Selektionsplatten ausplattiert.

Bei der Klonierung von pLC4-43 Pst I und Cla I Fragmenten in pBR322 (27) und bei der Verkleinerung von pPF3 durch Spaltung mit Eco RI und Religation (3.1.3.1.) wurden die H416 fhuA13 Transformanten auch danach selektioniert, ob sie mit Ferrichrom als Eisenquelle wachsen konnten. Die Transformantensuspension wurde dabei mit 2,7 ml TY-Weichagar vermischt, der 0,25 ml einer 20 mM Dipyridyllösung und 50 µl einer 0,2 mM Ferrichromlösung sowie 7 µg/ml Tetracyclin enthielt. Das Gemisch wurde anschließend sofort auf NB-Agarplatten ausgegossen und bei 37 °C inkubiert. Nach zwei bis drei Tagem Inkubation bildeten Transformanten, die zur Fe(III) Verwertung aus Ferrichrom fähig waren und die Tetracyclin resistent waren, Kolonien im Weichagar.

Bei den einzelnen Transformationen wurden von 3 bis 5 Transformantenkolonien einer Selektionsplatte Verdünnungsausstriche gemacht. Einzelkolonien dieser Verdünnungsausstriche auf TY-Tetracyclin oder TY-Ampicillinagarplatten testete man dann im Querstrichtest auf T5 und Albomycin Sensitivität oder man zog sie in TY - Medium zum Test des Wachstums mit Ferrichrom oder Rhodothorulasäure heran (2.2.5.).

2.2.5. T5 und Albomycin Sensitivitätstest — Untersuchung der Fähigkeit zum Wachstum mit Ferrichrom und Rhodothorulasäure

Die Sensitivitätsbestimmung eines Bakterienklons gegenüber den Bakteriophagen T5 und dem Antibiotikum Albomycin wurde hauptsächlich mit Hilfe eines Querstrichtests durchgeführt. Dabei wurde eine T5 Phagensuspension mit 10^8 bis 10^{10} pfu/ml auf der einen Hälfte einer TY-Agarplatte mit oder ohne Tetracyclin oder Ampicillin linear aufgebracht, so daß eine etwa 8 cm lange Linie entstand. Von der anderen Seite der Agarplatte ausgehend wurde, nach Eintrocknen der Phagensuspension, senkrecht zu der Phagenlinie mit einem an dem Ende abgeflachten Zahnstocher der zu testende Bakterienstamm über die T5 Phagenlinie bis zur gegenüberliegenden Seite der Platte gezogen. Auf der Seite der Platte, auf der der Bakterienausstrich begonnen wurde, wurde über diesen Ausstrich, im rechten Winkel zu diesem, ein etwa 8 cm langer, 0,4 cm breiter Saugpapierstreifen gelegt, der mit 0,1 ml einer o,3 mg/ml Albomycinlösung getränkt war. Nach der Inkubation der Testplatte bei 37 °C über Nacht war bei einem T5 und Albomycin sensitiven Bakterienstamm die Wachstumslinie um den Albomycinstreifen und um den T5 Streifen vollständig in einem größeren Bereich unterbrochen. Oft waren in dieser Hemmzone einige wenige Einzelkolonien gewachsen. Es wurden auch Klone getestet, die vollständige Wachstumshemmung durch T5 zeigten, die aber im Bereich des Albomycinstreifens keine oder nur eine schwache bis mittlere Hemmung des Wachstums der Zellen im Querstrich zeigten.

Die Verwertung von Ferrichrom oder Rhodothorulasäure zur Eisenversorgung wurde mit Hilfe eines Plattendiffusionstests geprüft. Außerdem wurde mit Hilfe eines solchen Tests auch auf Wachstum mit Albomycin getestet.

Der zu testende Bakterienstamm wurde in TY, bei Stämmen mit pPF3 oder pCF1 Abkömmlingen mit dem entsprechenden Antibiotikum, bis zur stationären Phase bei 37 °C inkubiert.

0,1 ml dieser Kultur wurde mit 2,7 ml flüssigem TY-Weichagar, der 0,25 ml Dipyridyl enthielt (bei 506 r^-m^-(1) fepA1/2 Klonen o,4 ml Dipyridyl) gut vermischt und auf NB-Agarplatten (35 ml NB-Agar/Platte) ausgegossen. Nach Erstarren des Weichagars wurde auf diesen je eine trockene Filterrondelle, die mit 20 µl einer 0,3 mg/ml Ferrichromlösung, eine die mit 20 µl einer 1 mg/ml Rhodothorulasäurelösung und gegebenenfalls eine, die mit 20 µl einer 0,3 mg/ml Albomycinlösung getränkt war , aufgelegt. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Wachstumshöfe um die Filterrondellen mit den Eisenkomplexbildnern bewiesen, daß der Bakterienstamm diesen Komplexbildner zur Eisenversorgung verwenden konnte, während ein Hemmhof um die Albomycin Filterrondelle auf die Albomycin Sensitivität des Stamms hinwies.

2.2.6. Isolierung der fhuA13 Mutante des Stamms H416

Jeweils 0,1 ml einer H416 Zellkultur und 0,1 ml einer T5 Phagensuspension (10^{10} pfu/ml) wurden durchmischt und bei 37 °C für 5 Min. inkubiert. Auf TY Agarplatten wurden dann jeweils 3 ml TY-Weichagar aufgebracht, der diese Mischung enthielt. Nach 24 Std. Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wuchsen in dem zunächst vollständig lysierten Bakterienrasen Einzelkolonien heran. Diese Einzelkolonien erwiesen sich in der Regel als T5 resistent. 24 T5 resistente Klone von verschiedenen Selektionsplatten testete man nun auf Wachstum mit Hilfe von Ferrichrom. Dazu wurden jeweils zu 2,5 ml TY-Weichagar o,25 ml einer 20 mM Dipyridyllösung, 0,05 ml einer 0,2 mM Ferrichromlösung und o,1 ml einer TY-Kultur in stationärer Phase zusammenpipettiert, gut durchmischt und auf NB-Agarplatten ausgegossen. Nach der Inkubation für 48 Std. bei 37 °C prüfte man bei den einzelnen Testplatten die allgemeine Trübung des Weichagars und die Zahl der im Weichagar gewachsenen Einzelkolonien, die Ferrichrom gut verwerten konnten.

Drei Bakterienklone H416 fhuA5, H416 fhuA7 und H416 fhuA13

wurden ausgewählt, die eindeutig Ferrichrom nicht zur Eisenversorgung verwerten konnten – der TY-Weichagar auf den NB-Agarplatten zeigte bei diesen Mutanten keine Trübung. Bei dem Ferrichrom Wachstumstest der Mutanten H416 fhuA5 und fhuA7 waren jedoch auf den Testplatten mehrere Einzelkolonien gewachsen, die wahrscheinlich auf Grund einer Reversion die Fähigkeit zur Verwertung des Ferrichrom gebundenen Fe(III) wiedererlangt haben. Dagegen waren auf den Testplatten des Klons H416 fhuA13 entweder keine oder nur ein oder zwei Einzelklone gewachsen. Nur bei H416 fhuA13 erwies sich also die Mutation, die zur T5 Resistenz führte und die zusätzlich den Verlust der Fähigkeit des Wachstums mit Ferrichrom mit sich brachte, als ausreichend stabil für weitere Untersuchungen.

2.2.7. Restriktion und Ligation von Plasmid DNS

Restriktionsversuche mit Plasmid DNS, die nur zur Bestimmung der Anzahl der Spaltstellen einer DNS Restriktionsendonuklease eines Plasmids und zur Bestimmung der Größe der Restriktionsfragmente dienten, wurden sowohl mit hochgereinigter Plasmid DNS durchgeführt, als auch mit Plasmid DNS, die mit einer Schnellmethode isoliert wurde (2.2.1.). Dagegen verwendete man für enzymatische DNS Spaltungen, deren Spaltprodukte in einem späteren Versuch wieder mit T4-DNS Ligase (29, 81) verknüpft wurden, nur durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gereinigte Plasmid DNS.

Bei der Spaltung mit einer bestimmten DNS Restriktionsendonuklease inkubierte man in der Regel 0,5 bis 2 µg Plasmid DNS in 10 bis 30 µl Inkubationslösung für 60 bis 120 Min. bei 37 °C mit der entsprechenden Endonuklease. Bei einem partiellen Verdau wurde auch kürzer inkubiert. Die Inkubationslösungen für die einzelnen Restriktionsenzyme hatten verschiedene Ionenzusammensetzungen und somit auch verschiedene pH Werte. Für die Versuche mit Bam HI, Cla I, Eco RI, Hind III, Pst I, Sal I, Sau 3a und Xho I wurden die vom Hersteller empfohlenen Inkubationslösungen benutzt.

(2.2.8., 2.2.9.3., 2.2.9.4.). Der enzymatische Spaltungsprozeß wurde durch die Zugabe von 0,5 µl bis 5 µl des verdünnten oder unverdünnten Enzympräparats zu den einzelnen Restriktionsansätzen eingeleitet. Alle Enzympräparate, außer Eco RI, konnten mit dem Inkubationspuffer verdünnt werden, dagegen erfolgte die Verdünnung von Eco RI mit der vom Hersteller empfohlenen Verdünnungslösung.

Nach der Inkubation bei 37 °C wurde der enzymatische Prozeß durch die Zugabe von 1/3 Volumen Stopmix zum Ansatz und durch 10 Min. langes Erhitzen auf 70 °C beendigt. Wenn die gespaltene Plasmid DNS mit T4-DNS Ligase behandelt werden sollte, erfolgte die Inaktivierung der Restriktionsenzyme nur durch 10 Min. langes Erhitzen bei 70 °C. Die DNS Proben, die Stopmix enthielten, wurden dagegen im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Der Ansatz für die DNS Spaltung mit einer Restriktionsendonuklease wurde wie folgt pipettiert:

10 µl Plasmid DNS Lösung (0,1 mg/ml)
2 µl RE-Ix10
8 µl Aqua dest.
1 µl DNS Restriktionsendonuklease

RE-Ix10: 10-fach konzentrierter Inkubationspuffer für die verwendete Restriktionsendonuklease

Die DNS Konzentration während einer Ligation betrug 0,01 bis 0,03 mg/ml. Die Ligation erfolgte nach der Zugabe von 0,5 bis 1 µl T4-DNS Ligase zu 30 µl Ligationsansatz. Der Ligationsansatz enthielt die mit einer Restriktionsendonuklease partiell oder vollständig gespaltene Plasmid DNS sowie das für die Aktivität der T4-DNS Ligase notwendige Ionenmilieu (81). Nach zwei Std. Inkubation mit der T4-DNS Ligase bei 12 °C wurde noch einmal 0,5 µl des Ligasepräparats zu den Ligationsproben gegeben. Nach weiteren zwei Stunden bei 12 °C wurden die Proben über Nacht bei 0 °C weiterinkubiert. Am anderen Morgen wurden 15 µl der Ligationsproben mit Stopmix versetzt und durch Agarosegelelektrophorese analysiert (2.2.3.), während der Rest für Transformationen

verwendet wurde (2.2.4.).
Die Ansätze für die Ligationen wurden wie folgt pipettiert:
Beispiel: 4,5 µl pPF3-Eco RI (900 ng DNS)
3 µl 10 mM ATP
1,5 µl 100 mM DTT
3 µl Lx10
17,5 µl Aqua dest.
0,5 µl T4-DNS Ligase
pPF3-EcoRI: pPF3 DNS nach Spaltung mit Eco RI
Lx10 : Ligasepuffer, 10-fach konzentriert: 500 mM Tris--HCl, 100 mM $MgCl_2$, 500 µg/ml Rinderserumalbumin, pH 7,5

2.2.8. Doppelspaltungen von Plasmid DNS durch Behandlung mit zwei verschiedenen DNS Restriktionsendonukleasen

DNS Restriktionsendonukleasen zeigen in Lösungen mit verschiedener Ionenzusammensetzung optimale Aktivität. Bei der Spaltung von Plasmid DNS mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen erfolgte zuerst die Inkubation mit dem ersten Enzympräparat im Inkubationspuffer für dieses Enzym. Anschließend wurde durch Zugabe von verschiedenen Mengen konzentrierter Salz- oder Pufferlösungen das Ionenmilieu so verändert, daß annähernd die Bedingungen geschaffen wurden, bei denen die zweite Restriktionsendonuklease gute DNS Spaltaktivität zeigte.

Pst I -Eco RI Doppelverdau

Pst I-Ix10: o,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,1 M $MgCl_2$, 1 mg/ml Gelatine, pH 7

Eco RI-Ix10: 1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,1 M $MgCl_2$, pH 7,5

pPF3-Pst I	Nachbehandlung mit Eco RI
2,6 µl pPF3 (1,5 g)	10 µl pPF3-Pst I
2 µl Pst I-Ix10	1 µl 0,9 M Tris-HCl, pH 7,5
14,4 µl Aqua dest	1 µl Eco RI-Ix10
1 µl Pst I	3 µl Aqua dest.
Restriktionszeit: 30 Min,	5 µl Eco RI (1:20 verdünnt)
dann 10 Min. bei 70 °C	Restriktionszeit: 60 Min.
	-Hitzeinaktivierung-Stopmix

Bam HI - Pst I Doppelverdau

Bam HI-Ix10: 0,06 M Tris-HCl, 0,2 M KCl, 0,06 M $MgCl_2$, 0,06 M DTT, pH 7,5

Pst I -Ix10: 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,1 M $MgCl_2$, 1 mg/ml Gelatine, pH 7

a) pPF3-Bam HI

2,6 µl pPF3 (1,5 µg)
2 µl Bam HI-Ix10
9,4 µl Aqua dest.
3 µl Bam HI (1:3 verdünnt)
Restriktionszeit: 50 Min.-
-10 Min. bei 70 °C

b) Nachbehandlung mit Pst I

10 µl Ansatz a)
1 µl 0,5 M NaCl
20 µl Pst I-Ix1
1 µl Pst I
Restriktionszeit: 40 Min.-
-Stopmix-Hitzeinaktivierung

Bam HI - Eco RI Doppelverdau

Bam HI-Ix10: siehe oben

Eco RI-Ix10: 1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,1 M $MgCl_2$, pH 7,5

a) pPF3-Bam HI

siehe oben

b) Nachbehandlung mit Eco RI

10 µl Ansatz a)
1 µl 0,5 M NaCl
1 µl Eco RI-Ix10
3 µl Aqua dest.
5 µl Eco RI (1:20 verdünnt)
Restriktionszeit: 60 Min.
-Stopmix -Hitzeinaktivierung

Pst I - Hind III Doppelverdau

Pst I-Ix10: 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,1 M $MgCl_2$, 1 mg/ml Gelatine, pH 7

Hind III-Ix10: 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,1 M $MgCl_2$, 0,14 M DTT, pH 7,6

a) pPF3-Pst I

wie bei Pst I - Eco RI

b) Nachbehandlung mit Hind III

10 µl Ansatz a)
1 µl 0,14 M DTT
5 µl Hind III (1:10 verdünnt)
Restriktionszeit: 50 Min.
-Stopmix - Hitzeinaktivierung

Bam HI - Hind III Doppelverdau

Bam HI-Ix10: 0,06 M Tris-HCl, 0,2 M KCl, 0,06 M $MgCl_2$, 0,06 M DTT, pH 7,5

Hind III-Ix10: 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,1 M $MgCl_2$ 0,14 M DTT, pH 7,6

a) pPF3-Bam HI

wie bei Bam HI-Pst I

b) Nachbehandlung mit Hind III

0,4 µl 0,2 M $MgCl_2$

7,5 µl Ansatz a)

5,5 µl Aqua dest.

1,5 µl 0,14 M DTT

5 µl Hind III (1:10 verdünnt)

Restriktionszeit: 50 Min.

-Stopmix -Hitzeinaktivierung

Cla I - Pst I, Cla I - Eco RI, Cla I - Hind III und Cla I - Bam HI Doppelverdau

Cla I-Ix10: 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M $MgCl_2$, pH 8

Pst I-Ix10: 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,1 M $MgCl_2$, 1 mg/ml Gelatine, pH 7

Eco RI-Ix10: 1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,1 M $MgCl_2$, pH 7,5

Hind III-Ix10: 0,1 M $MgCl_2$, 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,14 M DTT, pH 7,6

Bam HI-Ix10: 0,06 M Tris-HCl, 0,2 M KCl, 0,06 M $MgCl_2$, 0,06 M DTT, pH 7,5

a) Verdau mit Cla I

5 µl pPF3 (3 g DNS)

1,5 µl ClaI-Ix10

7,5 µl Aqua dest.

2 µl Cla I (1:1 verdünnt)

Restriktionszeit: 50 Min.-

-10 Min. bei 70 °C inaktivieren

b) Nachbehandlung mit Pst I

5 µl Ansatz a)

1 µl 500 mM NaCl

15 µl Pst I-Ix1

1 µl Pst I

Restriktionszeit: 50 Min.

-Stopmix -Hitzeinaktivierung

c) Nachbehandlung mit Eco RI

15 µl Ansatz a)

1,5 µl 0,04 M $MgCl_2$

2 µl 0,5 M NaCl

2 µl 0,9 M Tris-HCl, pH 7,5

3 µl Eco RI (1:4 verdünnt)

-Stopmix -Hitzeinaktivierung

d) Nachbehandlung mit Hind III

15 µl Ansatz a)
1 µl 0,04 M $MgCl_2$
2 µl 0,5 M NaCl
2 µl o,14 M DTT
5 µl Hind III (1:10 verdünnt)
Restriktionszeit: 60 Min.
-Stopmix -Hitzeinaktivierung

e) Nachbehandlung mit Bam HI

15 µl Ansatz a)
1,5 µl 0,04 M $MgCl_2$
2 µl o,9 M Tris-HCl, pH7,5
4 µl Bam HI (1:1 verdünnt)
Restriktionszeit: 60 Min.
-Stopmix -Hitzeinaktivierung

Pst I - Sal I Doppelverdau

Pst I-Ix10: 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,1 M $MgCl_2$, 1 mg/ml Gelatine, pH 7

Sal I-Ix10: 0,06 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, 0,06 M $MgCl_2$, 0,06 M DTT, pH 7,9

a) pPF3 - Pst I

5 µl pPF3 (3 µg DNS)
2 µl Pst I-Ix10
13 µl Aqua dest.
1 µl Pst I
Restriktionszeit: 45-60 Min.
10 Min. bei 70 °C

b) Nachbehandlung mit Sal I

10 µl Ansatz a)
2 µl Aqua dest.
1,2 µl 1,1 M NaCl, 0,02 M EDTA, 0,06 M DTT
1 µl Sal I
Restriktionszeit bei vollständigem Verdau: 60 - 90 Min.
-bei partiellem Sal I Nachverdau: 20 - 40 Min.
-Stopmix -Hitzeinaktivierung

2.2.9. Restriktions- und Ligationsansätze bei der Suche nach Plasmidvarianten

2.2.9.1. Partielle Spaltung der Tn5 Insertionsplasmide und Religation

Jeweils 2 µg der durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gereinigten Plasmid DNS (2.2.1.) in 20 µl Xho I Inkubationslösung (2.2.7.) wurden 4 bis 8 Min. lang mit verschiedenen Mengen Xho I inkubiert und dann sofort für 10 Min. bei 70 °C inaktiviert, so daß sich eine partielle Xho I Spaltung der Plasmid DNS ergab. Die Restriktionszeiten und die Menge an Restriktionsenzym für den partiellen Plasmidverdau

waren in einem Vorversuch bestimmt worden. Der Grad der Xho I Spaltung konnte nach Auftrennung der Plasmid DNS durch Agarosegelelektrophorese festgestellt weden (2.2.3.). Die im Restriktionsansatz vorhandenen Xho I Spaltprodukte wurden anschließend wie beschrieben (2.2.7.) mit T4-DNS Ligase behandelt. Die DNS Konzentration während der Ligation betrug 0,02 mg/ml. Die Ligase behandelte DNS wurde dann für die einzelnen Ligationen verwendet.

2.2.9.2. Ligation von partiell mit Sal I gespaltener DNS von pFB5/101 und von Sal I gespaltenem pPF3/V1

a) partielle Sal I Spaltung von pFB5/101

5 µl pFB5/101 (2 µg)
2 µl Sal I-Ix10
12 µl Aqua dest.
1 µl Sal I
Restriktionszeit: 20 Min., dann 10 Min. bei 70 °C

b) Sal I Spaltung von pPF3/V1

18 µl pPF3/V1 (2 µg)
2 µl Sal I-Ix10
1 µl Sal I
Restriktionszeit: 20 oder 25 Min., dann 10 Min. bei 70 °C

c) Ligation

Ein Gemisch von 4 µl pFB5/101, mit Sal I behandelt, und 5 µl pPF3/V1, mit Sal I behandelt, wurden in 30 µl Ligationsansatz (2.2.7.) mit T4 DNS Ligase inkubiert. Die ligierte DNS wurde zur Transformation von H416 fhuA13 verwendet

2.2.9.3. Behandlung von pPF3/V1 mit Eco RI* und Religation

Eco RI*Ix10: 250 mM Tris-HCl, 20 mM $MgCl_2$, pH 8,5.
In einem Vorversuch zeigte sich, daß Eco RI* eine bessere Spaltungsaktivität entfaltete, wenn im Restriktionsansatz noch 25 % Glycerin enthalten war.

a) pPF3/V1 - Eco RI*

20 µl pPF3/V1 (2 µg)
4 µl Eco RI*-Ix10
10 µl Glycerin
1 µl Aqua dest.
5 µl Eco RI (1:10 verdünnt)
Restriktionszeit: 30 oder 60 Min., dann 10 Min. bei 70°C.

b) Ligation:
8 µl pPF3/V1, geschnitten mit Eco RI* (Ansatz a), wurden jeweils in 30 µl Ligationsansatz mit T4-DNS Ligase inkubiert (2.2.7.). Die mit T4-DNS Ligase behandelten Proben wurden zur Transformation der Stämme H416 fhuA13 und H416 ArIV-1 verwendet.

2.2.9.4. Inkubation von Xho I linearisiertem pPF3/V1 mit Sau 3a und Ligation

Xho I-Ix10: 80 mM Tris-HCl, 60 mM $MgCl_2$, 60 mM 2-Mercaptoäthanol, 1,5 M NaCl, pH 7,4

Sau 3a-Ix10: 100 mM Tris-HCl, 100 mM $MgCl_2$, 100 mM 2-Mercaptoäthanol, 500 mM NaCl, 1 mg/ml Rinderserumalbumin, pH 7,4

Es wurde in einem Vorversuch festgestellt, daß Xho I auch in dem für Sau 3a optimalen Ionenmilieu gute Spaltaktivität zeigte. Außerdem wurde dabei auch die Einwirkungszeit von Sau 3a auf die Xho I linearisierte Plasmid DNS für einen partiellen Sau 3a Verdau bestimmt.

a) pPF3/V1-Xho I und Sau 3a Verdau

20 µl pPF3/V1 (2 µg DNS)
3 µl Sau 3a-Ix10
2 µl Aqua dest.
5 1 Xho I (1:5 verdünnt)
Restriktionszeit: 90 Min., dann 10 Min. bei 70 °C inaktiviert
+ 2,5 µl Sau 3a (1:5 verdünnt)
Restriktionszeiten 10, 15 oder 25 Min.; dann 10 Min. bei 70°C.

b) Ligation:
Jeweils 6 µl (0,4 µg) des Ansatzes a) wurden in 30 µl Ligationslösung mit T4-DNS Ligase behandelt (2.2.7.). Die Ligase behandelte DNS wurde für die Transformation von H416 fhuA13 und H416 ArIV-1 verwendet.

2.2.9.5. Verkleinerung von Plasmiden durch partiellen Verdau und Religation

Bei der Verkleinerung von pPF3, pPF3/V1 und pPF3/V1 del2-15 durch partiellen Sal I Verdau sowie von pPF3 und pPF3/V1 durch partiellen Pst I Verdau und anschließender Religation, wurde zunächst jeweils die Inkubationsbedingung für den betreffenden partiellen Verdau mit Sal I beziehungsweise Pst I in einem Vorversuch bestimmt. Im eigentlichen Ver-

such wurde dann die partiell mit Sal I oder Pst I gespaltene Plasmid Probe nach 10 Min. langem Erhitzen bei 70 °C mit T4-DNS Ligase im entsprechenden Ligationsansatz behandelt (2.2.7.). Die DNS Konzentration während der Ligation betrug in der Regel 0,02 mg/ml. Die Ligase behandelten DNS Proben wurden dann zur Transformation von H416 fhuA13, H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Ar6 oder Ar12 verwendet.

2.2.10. Isolierung einer r^-m^- Mutante des Stamms H506

Bei der Isolierung der Restriktions- und Modifikationsdefekten Mutante von H506 ging man von einem nicht K12 spezifisch modifizierten λCI(ts)::Tn10 Phagenlysat mit 10^9 pfu/ml aus. Dieses Phagenlysat wurde nach Hitzeinduktion des λCI(ts)::Tn10 lysogenen Stamms H562 r^-m^- und nach Vermehrung auf HB101 (r^-m^-) erhalten.

Wie in der Literatur beschrieben (56) wurde nun jeweils 0,1 ml einer H506 r^+m^+ Bakterienkultur, die in λ-ym Medium bis zu einer OD_{578} von 1,5 gewachsen war, mit 0,1 ml dieser Phagensuspension versetzt und für 20 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Dieses Gemisch wurde anschliessend auf TY-Tetracyclin Agarplatten ausplattiert und bei 27 °C zwei bis drei Tage lang inkubiert. Es wurde nun versucht unter einem nach dieser Zeit gewachsenen Klon, der nur dann auf Tetracyclin Agarplatten wachsen konnte, wenn er λCI(ts)::Tn10 lysogen enthielt, eine H506 r^-m^- Variante zu finden. Da ein nicht K12 spezifisch modifiziertes λ Lysat einen r^+m^+ Stamm nur sehr selten erfolgreich infizieren kann, war es wahrscheilich, unter den λCI(ts)::Tn10 lysogenen Tetracyclin resistenten Klonen eine r^-m^- Variante zu finden, die nur auf Grund dieser Eigenschaft erfolgreich mit dem Phagen infiziert wurde.

Von 42 λCI(ts)::Tn10 lysogenen Klonen, die auf mehreren Testplatten gewachsen waren, erwiesen sich im Test auf die Fähigkeit zur Restriktion nicht K12 spezifisch modifizierter DNS, der mit λvir Phagen mit nicht modifizierter DNS durchgeführt wurde, nur 2 Klone als sensitiv gegenüber mehreren Verdünnungen des λvir Lysats. Aus

Kulturen dieser lysogenen Mutanten, H506 r^-(1) und H506 r^-(2), wurden durch Hitzeinduktion des Prophagen die entsprechenden λCI(ts)::Tn10 Phagenlysate hergestellt, die nur den Stamm HB101 (r^-m^-) nicht aber den Stamm H506(r^+m^+) erfogreich infizieren und lysieren konnten. Beide selektionierte r^- Varianten von H506 waren also auch nicht mehr zur K12 spezifischen Modifikation der DNS fähig. Von H506 r^-m^-(1) wurde auf einer Agarplatte mit einem Ausstrich dieser Mutante, nach Inkubation bei 42 °C schließlich ein nicht λCI(ts)::Tn10 lysogener, Tetracyclin sensitiver Klon isoliert, der weiter Verwendung fand.

2.2.11. Isolierung von H506 r^-m^-(1) fepA1/2

Auf 4 TY-Agarplatten wurden jeweils 0,1 ml einer Kultur von H506 r^-m^-(1) in früher logarithmischer Wachstumsphase ausplattiert. Im Zentrum jeder Platte wurden 0,05 ml einer Verdünnung (1:50) einer Colicin B Lösung verteilt. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am anderen Morgen wurden pro Agarplatten 2 Kolonien, die innerhalb des Colicin B Hemmhofs gewachsen waren, im Verdünnungsausstrich vereinzelt. Zwei Einzelkolonien dieser 8 Klone wurden jeweils im Querstrichtest auf T5, Albomycin und Colicin B Sensitivität getestet. Außerdem wurde die Wachstumsförderung um Ferrichrom und Rhodothorulasäure getränkte Filterrondellen im Plattendiffusionstest untersucht (2.2.5.). Von den 8 Klonen erwiesen sich alle als Colicin B resistent und T5 und Albomycin sensitiv. Jedoch nur die Hälfte dieser Klone zeigten um die Filterrondellen eine bessere Wachstumsstimulierung als H506 r^-m^-(1). Unter diesen Klonen wurde der Stamm H506 r^-m^-(1) fepA1/2 ausgesucht, der um die Filterrondelle mit Ferrichrom einen deutlichen Wachstumsring mit kleineren Radien und um jene mit Rhodothorulasäure einen schwächeren Wachstumsring mit größeren Radien bildete.

2.2.12. Isolierung von Albomycin resistenten Kolonien von H416 und von H506 r^-m^-(1) fepA1/2

Auf mehrere TY-Agarplatten wurden jeweils 0,1 ml einer Zellsuspension verschiedener H416 TY Kulturen oder verschiedener H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Kulturen in spätlogarithmischer Wachstumsphase ausplattiert. Danach verteilte man im Zentrum dieser Agarplatten jeweils 0,05 ml einer Albomycinlösung (0,3 mg/ml) mit einer Spatel. Nach 24 Std. Inkubation bei 37 °C wurden von jeder Platte aus dem Albomycinhemmhof 4 Albomycin resistente Kolonien im Verdünnungsausstrich vereinzelt. Diese Kolonien bezeichnete man bei H416 nach der Selektionsplatte und der Kolonie-Nr. mit Ar1/1, Ar1/2, oder ArI/1 und ArI/2 usw. beziehungsweise bei H506 r^-m^-(1) fepA1/2 einfach mit Ar1 bis Ar16. Die gereinigten Albomycin resistenten Klone wurden dann auf Wachstum mit Ferrichrom, Rhodothorulasäure und Albomycin und auf T5 Sensitivität getestet (2.2.5.) und dann für die einzelnen Transformationen des Komplementationsversuchs herangezogen.

2.2.13. Isolierung von T5 resistenten Mutanten von H506 und H507

Jeweils 0,1 ml einer TY Übernachtkultur des Stamms H506 beziehungsweise H507 wurde mit 0,1 ml einer Phagensuspension, die etwa 10^9 T5 Phagen pro ml enthielt, versetzt und 5 Min. lang bei 37 °C stehend inkubiert. Danach wurden jeweils 2,8 ml TY-Weichagar zu den Adsorptionsgemischen gegeben, gut durchmischt und das Gemisch auf einer TY-Agarplatte ausgegossen. Nach 36 Std. Inkubation bei 37 °C waren auf den Selektionsplatten, die zunächst konfluente Lyse zeigten, jeweils 2 bis 50 T5 resistente Klone gewachsen. Diese Klone wurden im Verdünnungsausstrich vereinzelt. Einzelkolonien dieser Verdünnungsausstriche testete man dann auf T5 Sensitivität. Sowohl unter H506 als auch unter H507 T5 resistenten Klonen wurde jeweils ein T5 resistenter Bakterienklon ausgewählt, den man mit H506 fhuA1 und mit H507 fhuA1 bezeichnete.

2.2.14. Nachweis von Plasmid codierten Proteinen im Minizellsystem

2.2.14.1. Isolierung der Minizellen

Eine bestimmte Transformante des Minizellstamms H506 fhuA1 oder H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Ar6 (3.3.1.) wurde in 350 ml TY-Medium mit 7 µg/ml Tetracyclin oder 20 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37 °C bis zur stationären Phase gezüchtet. Das zur Inkubation verwendete TY-Medium entielt zusätzlich noch 1 g Glucose pro l Medium.

Am anderen Morgen zentrifugierte man die Zellen mit 14 000 x g im GS3 Rotor der Sorvall Zentrifuge 15 Min. bei 4 °C ab. Das Sediment wurde dann bei 4 °C mit 10 ml M9-Puffer gut resuspendiert und auf zwei Sacharosedichtegradienten (etwa 10% bis 30%) aufgetragen. Diese Gradienten wurden durch Einfrieren bei -20 °C und langsames Auftauen bei 4 °C einer 20% Sacharoselösung in M9-Puffer in den Zentrifugenröhrchen für den SW 27 Rotor der Beckmann Ultrazentrifuge hergestellt.Die Sacharosedichtegradienten wurden dann bei 4 °C mit dem SW 27 Rotor mit 5 000 UpM zentrifugiert. Die Minizellbanden wurden mit einer Pasteurpipette gesammelt und vereinigt. Diese Minizellsuspension wurde sofort mit dem gleichen Volumen M9-Puffer verdünnt und 15 Min. mit 27 000 x g bei 4 °C im SS 34 Rotor der Sorvall Zentrifuge abzentrifugiert. Die Minizellsedimente einer Transformanten wurden nach der Zentrifugation in 5 ml M9-Puffer resuspendiert. Die in dieser Suspension enthaltenen Minizellen wurden noch einmal durch zwei anschließende Sacharosedichtegradientenzentrifugationen gereinigt. Vor der letzten Dichtegradientenzentrifugation wurde das Minizellsediment mit 5 ml M9-Medium, das Thiamin enthielt (1 µg/ml), resuspendiert.
Nach der letzten Dichtegradientenzentrifugation wurde die OD_{600} der mit Thiamin haltigem M9-Medium 1:1 verdünnten, isolierten Minizellfraktion bestimmt. Die Minizellen zentrifugierte man dann mit 27 000 x g in der Sorvallzentri-

fuge 15 Min. lang bei 4 °C ab und resuspendierte sie mit soviel Thiamin haltigem M9-Medium, daß die OD_{600} der Suspension 1 betrug.

2.2.14.2. Markierung der Proteinsynthese der Minizellen

Bei der Markierung der in den Minizellen synthetisierten Proteine wurde in der Regel 1 ml einer Minizellsuspension in Thiamin haltigem M9-Medium für 30 Min. im 37 °C warmen Schüttelbad vorinkubiert. Dann wurden bei den ersten Versuchen 20 µg Ampicillin oder 7 µg Tetracyclin in Lösung, je nach den Resistenzeigenschaften der untersuchten Plasmide, zugegeben und für weitere 30 Min. inkubiert. In späteren Versuchen wurde die zu den Kulturen gegebene Antibiotikamenge auf 2 µg/ml Ampicillin oder 0,7 µg/ml Tetracyclin reduziert.

Die Markierung erfolgte nach Zugabe von 5 µCi (100 µl) eines ^{14}C-Aminosäurengemisches 90 Min. lang bei 37 °C. Die markierten Minizellen wurden auf 4 °C abgekühlt, in der Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert und mit M9 Medium gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellsedimente mit 25 bis 50 µl Probenauftragspuffer der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese resuspendiert und dann wie beschrieben (2.2.16.) weiter behandelt. Einige Gesamtzellproteinproben wurden auch ohne vorheriges Kochen aufgetragen.

In einigen der Fällen erfolgte die Markierung auch in M9-Medium, das Thiamin und noch zusätzlich Dipyridyl enthielt (200 µM oder 400 µM).Dieses wurde dann 10 Min. vor der eigentlichen Markierung zugegeben.

2.2.14.3. Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der Minizellgesamtproteine erfolgte meistens parallel in einem 15% - 0,28% Acrylamid - Bisacrylamidgel und einem 11% - 0,5% Gel (2.2.16.). Die Elektrophorese des 15% Gels wurde zur besserem Auftrennung der Proteine mit einem Molekulargewicht von 30 K etwa 2 Std.

lang mit 20 mA nach Austritt der Bromphenolblaubande aus dem Gel weiter unter Spannung belassen. Das 11% - 0,5% Gel diente hauptsächlich zum Nachweis von niedermolekularen Proteinen. Die Elektrophorese diese Gels wurde bis zum Austritt der Bromphenolblaubande mit 20 mA betrieben. Mit den getrockneten Gelen erfolgte dann die Fluorographie (2.2.17.).

2.2.15. Nachweis von Plasmid codierten Proteinen mit Hilfe des Maxizellsystems

2.2.15.1. Aufzucht der Zellen und Bestrahlung mit UV-Licht

Eine im Maxizellsystem zu untersuchende H507 fhuA1 Transformante wurde in M9-Medium (o,4 % Glucose), das je nach Plasmid 7 µg/ml Tetracyclin oder 20 µg/ml Ampicillin enthielt, bis zu einer OD_{578} von 0,5 inkubiert. Wenn später sowohl die äußere Bakterienmembran als auch die Gesamtmembran isoliert werden sollte, wurden von dieser Kultur 2 x 7,5 ml abzentrifugiert und die Zellsedimente danach mit 2 x 15 ml M9-Puffer resuspendiert.Diese 2 x 15 ml wurden je in eine Petrischale gegossen und mit einer UV-Lampe (Orginal Hanau-Sterisol-30 W) im Abstand von 1 Meter 25 Sek. lang mit UV-Licht bestrahlt. Während der Bestrahlung wurden die offenen Petrischalen hin und her bewegt, um eine Durchmischung der Zellen zu gewährleisten. Nach der Bestrahlung wurden die Zellsuspensionen im Dunkeln in Erlenmeyerkolben überführt und mit Glucose, $CaCl_2$, $MgCl_2$ und dem entsprechenden Antibiotika versetzt, sodaß sich die Zusammensetzung des M9-Antibiotikamediums ergab. Die Kulturen wurden bei 37 °C für 16 Std. im Dunkeln im Schüttelbad inkubiert.

2.2.15.2. Markierung der synthetisierten Proteine

Die Zellkulturen wurden nach der Nachinkubation bei 4 °C mit 4 500 x g abzentrifugiert und mit jeweils etwa 6,2 ml M9-Medium mit dem entsprechendem Antibiotikum resuspendiert. Die resuspendierten Zellproben wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben gefüllt und 30 Min. lang bei 37° C im Schüttelbad vorinkubiert.

Die Markierung der synthetisierten Proteine erfolgte nach Zugabe von jeweils 4 µCi ^{14}C-Aminosäurengemisch zu einem Markierungsansatz 90 Min. lang bei 37 °C im Schüttelbad. Nach der Markierung wurden die markierten Zellen einmal mit M9-Puffer gewaschen und wieder abzentrifugiert. Vor dieser letzten Zentrifugation wurde den 6,2 ml Zellsuspensionen aber 1 ml entnommen und getrennt abzentrifugiert. Die Zellen von diesem ml wurden später direkt durch Kochen mit 25 µl Auftragmix für die Polyacrylamidgelelektrophorese vorbereitet (2.2.16.). Das Lysat dieser Proben enthielt die Proteine der gesamten Zelle. Die Zellsedimente der übrigen 5,2 ml wurden für die Isolierung der äußeren Membran oder der Gesamtmembran bei -20 °C eingefroren.

2.2.15.3. Isolierung der Gesamtmembran und der äußeren Membran

Bei der Isolierung der Gesamtmembran wurden die markierten Zellen mit 0,35 ml 0,75 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl, pH7,8 bei 4 °C resuspendiert. Anschließend wurde 0,013 ml einer Lysozymlösung (2 mg/ml Lysozym) zugegeben und 2 Min. bei 4 °C inkubiert. Danach verdünnte man dieses Gemisch langsam mit kalter 1,5 mM EDTA Lösung, pH 8 (0,7 ml). Die Sphäroplasten, die sich in dieser Zeit gebildet hatten, wurden durch 3 x 15 Sek. langes Beschallen mit Ultraschall in der Kälte aufgebrochen. Wenn die Zellen nach dieser Zeit noch nicht gut lysiert waren, wurde die Beschallung wiederholt. Ganze Zellen wurden 15 Min. lang bei 4 °C mit 1 200 x g abzentrifugiert. Zu dem Überstand mit den Membranen gab man einige Kristalle Rinderpankreas DNAse und inkubierte für 10 Min. bei Zimmertemperatur. Anschließend wurden die Membrane 2 bis 3 Std. mit 45 000 x g im SS 34 Rotor der Sorvallzentrifuge abzentrifugiert. Die Sedimente wurden mit 0,1 ml Aqua bidest. resuspendiert und erneut wie zuvor abzentrifugiert. Die gewaschenen Membrane wurden später in 25 µl Probenauftragsmix für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese resuspendiert und 4 Min. lang auf 95 °C erhitzt.

Die Elektrophorese und die Fluorographie der getrockneten Gele erfolgte wie beschrieben (2.2.16., 2.2.17.).

Die Isolierung der äußeren Membran der gewaschenen Zellsedimente von 5,2 ml des Markierungsansatzes (2.2.15.2.) erfolgte nach der Methode von Schnaitmann modifiziert nach Hantke (62, 33) durch Behandlung von Sphäroplasten mit 1 % Triton X-100 in Gegenwart von $MgCl_2$. Die gewaschenen, sedimentierten äußeren Membrane wurden dann in 25 µl Probenauftragsmix solubilisiert und wie die Gesamtmembrane weiter behandelt.

2.2.16. Auftrennung von Gesamtzellprotein oder von Membranprotein durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Zellprotein oder Membranprotein erfolgte durch Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart von 0,1 % SDS im Gelsystem nach Lugtenberg (47). Die für dieses Gelsystem vorgeschriebenen Mengen an Acrylamid, Bisacrylamid und Aqua dest. wurden jedoch so variiert, daß nicht nur 11 %, 0,2 % Acrylamid - Bisacrylamidgele, sondern auch 11 %, 0,5 % Acrylamid - Bisacrylamidgele beziehungsweise 15 %, 0,28 % Gele erhalten wurden.

Die Zell- beziehungsweise die Membransedimente wurden vor dem Auftragen auf das Gel in dem vorgeschriebenen Auftragsmix, der SDS (2 %) und 2-Mercaptoäthanol (5 %) enthielt, 3 bis 4 Min. lang gekocht. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Comassie-Brilliant-Blue gefärbt und nach Vorschrift wieder entfärbt. Gele, in denen Minizellgesamtproteine aufgetrennt wurden, legte man vor der Färbung zur Fixierung der Proteine in den Gelen teilweise 1 Std. lang in eine 12,5 % Trichloressigsäurelösung.

2.2.17. Fluorographie

Die entfärbten Acrylamidgele mit markierten Zellproteinen wurden zunächst 1 Std. lang in 100 ml Enhance gelegt, anschließend 1 Std. lang in eiskaltem Aqua dest. gewaschen und dann getrocknet. Die Fluorographie erfolgte durch die Exponierung eines Röntgenfilms (X-Omat der Firma Kodak) bei -70 °C.

3. Ergebnisse

3.1. Plasmidkonstruktionen

3.1.1. Klonierung der fhuA Genregion in pBR322

Die Plasmide pLC4-43 und pLC19-19 der Clark und Carbon Genbank des Escherichia coli K12 Chromosoms (20,21) sind Hybridmoleküle, die aus Col E1 DNS und chromosomaler DNS zusammengesetzt sind. pLC4-43 und pLC19-19 enthalten verschiedene DNS Anteile der chromosomalen Region, die auch fhuA enthält (2, 75).

Es wurde gezeigt (26), daß pLC4-43 den T5 resistenten Bakterienstamm H416 fhuA13 (2.2.6.) nach Transformation zur T5 Sensitivität, zur Sensitivität gegen Albomycin und zum Wachstum auf Ferrichrom und Rhodothorulasäure als einzige Eisenquelle komplementieren kann. Dagegen waren pLC19-19 Transformanten zwar T5 sensitiv, sie blieben aber Albomycin resistent und wuchsen auch nicht mit den Eisenkomplexbildnern (Tab. 1). Hieraus wurde geschlossen, daß die Mutation in H416 fhuA13 nicht nur das fhuA Gen inaktivierte, sondern auch den benachbarten DNS Bereich, der für die Ferrichromtransportkomponenten in der Cytoplasmamembran codieren soll (16, 41). Da pLC 4-43 den gesamten DNS Bereich enthielt, der die fhuA13 Mutation von H416 komplementieren konnte, während pLC19-19 diese Mutation nicht vollständig komplementierte, ging man bei der Klonierung der fhuA Region in pBR322 von pLC4-43 aus.

Die Klonierung des DNS Bereichs mit dem fhuA Genbereich aus pLC4-43 in pBR322 gelang einmal nach vollständigem Verdau von pLC4-43 (Molekulargewicht: 15,2 Md) mit Cla I und Ligation mit Cla I geschnittener pBR322 DNS (Abb. 4). Hierbei wurde durch die Insertion des pLC4-43 Cla I Fragments in die Cla I Schnittstelle von pBR322 (48) der Tetracyclin Resistenzbereich von pBR322 inaktiviert. Das selektionierte Plasmid, das mit pCF1 bezeichnet wurde, konnte aus einem Ampicillin resistenten , Tetra-

cyclin sensitiven und T5 sensitiven H416 fhuA13 Transformantenklon isoliert werden, der zum Wachstum mit Ferrichrom bei Eisenmangelbedingungen (2.2.4.) befähigt war (Tab. 1). Die Größe des in pBR322 inserierten Cla I Fragments, die bei der Restriktionsanalyse des Plasmids pCF1 bestimmt wurde, war 8,9 Md. Bei den Bestimmungen des Molekulargewichts der linearisierten pBR322 DNS ergab sich mit den hier verwendeten Agarosegelen ein Molekulargewicht von 2,85 Md, sodaß das Molekulargewicht von pCF1 insgesamt etwa 11,75 Md betrug.

Andererseits konnte die gesamte fhuA Region auch nach partiellem Verdau von pLC4-43 mit Pst I (19) und nach Religation mit Pst I geschnittener pBR322 DNS aus einem H416 fhuA13 Transformantenklon auf pBR322 erhalten werden (Abb.4). Das hierbei selektionierte Plasmid pPF3 komplementierte den Teststamm genauso wie pCF1 zur T5 und Albomycin Sensitivität und zum Wachstum mittels Ferrichrom und Rhodothorulasäure. Auf Grund der Integration des partiell verdauten Pst I Fragments in die PstI Schnittstelle von pBR322 wurde die Ampicillin Resistenzregion (7, 72) inaktiviert; das bedeutete, daß pPF3 Transformanten Tetracyclin resistent und Ampicillin sensitiv waren. Die Größe des in pBR322 inserierten, partiell verdauten pLC4-43 Pst I Fragments betrug auch etwa 8,9 Md, sodaß sich für pPF3 ein Molekulargewicht von 11,75 Md ergab.

Schließlich konnte beim Klonierungsversuch mit Pst I aus einem H416 fhuA13 Transformantenklon, der Tetracyclin resistent, Ampicillin sensitiv, T5 sensitiv jedoch Albomycin resistent war, noch das Plasmid pPT14 mit einem Molekulargewicht von 6,35 Md isoliert werden. Dieses Plasmid entstand durch Insertion eines 3,5 Md Pst I Fragments von pLC4-43 in die Pst I Schnittstelle von pBR322. Das inserierte DNS Fragment von pPT14 enthielt also nur die Information, die für das Wachstum mittels Ferrichrom

oder Rhodotorulasäure notwendig ist.

Tab. 1: Test von H416 *fhuA*13 und dessen Transformantenklone auf T5, Albomycinsensitivität und auf Wachstum mit Hilfe von Ferrichrom und Rhodotorulasäure (2.2.5.).

Stamm H416 *fhuA*13 transformiert mit	Sensitivität gegenüber T5	Albomycin	Wachstum mit Ferrichrom	Rhodotorulasäure
0	-	-	-	-
pLC19-19-	+	-	-	-
pLC 4-43	+	+	++	+
pPF3	+	+	++	+
pCF1	+	+	++	+
pPT14	+	-	-	-

Erläuterung: 0 = H416 *fhuA*13 ohne Plasmid; ++, + = sehr gute beziehungsweise gute Wachstumsförderung oder Sensitivität; - = kein Wachstum oder Resistenz.

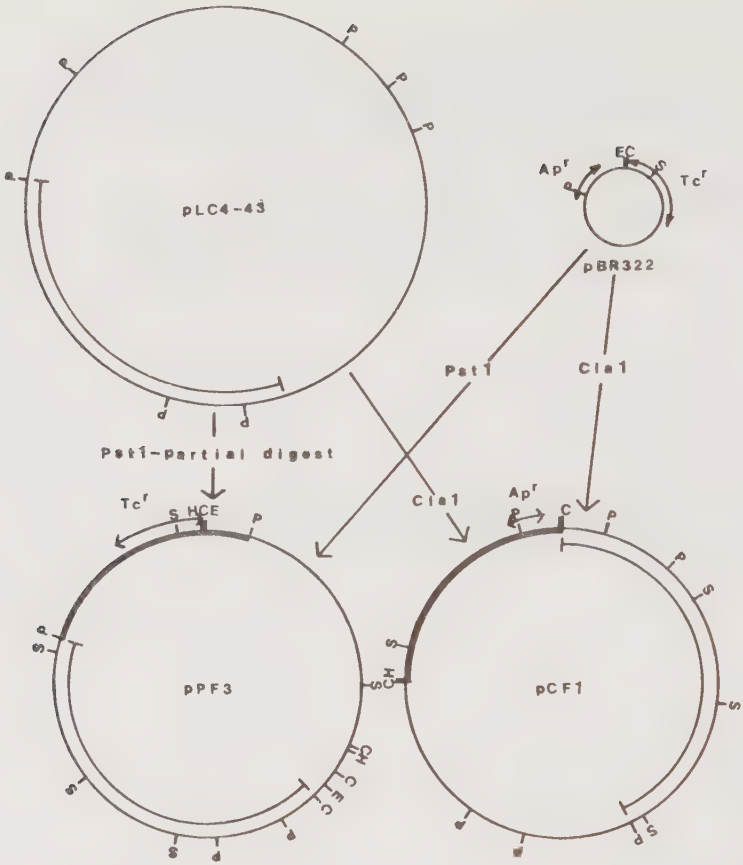


Abb. 4: Klonierung der chromosomalen Genomregion um fhuA aus pLC4-43 nach vollständigem Cla I Verdau, beziehungsweise nach partiellem Pst I Verdau der Plasmid DNS in die entsprechenden Schnittstellen des Plasmids pBR322. Durch die Insertion in die Cla I Erkennungsstelle von pBR322 beim Plasmid pCF1 wurde der Tetracyclinresistenzbereich von pBR322 inaktiviert, während durch die Insertion in die Pst I Schnittstelle von pBR322 bei pPF3 die Ampicillinresistenzregion inaktiviert wurde. In den circulären Plasmidkarten von pCF1 und pPF3 ist die DNS von pBR322 durch eine dick gezogene Linie gekennzeichnet. Die einfach gezogene Linie stellt den in pBR322 klonierten pLC4-43 DNS Anteil dar. Die

Schnittstellen der Restriktionsenzyme Cla I (C), Eco RI (E), Pst I (P), Sal I (S), und Hind III (H) sind sowohl für pBR322 als auch für die klonierten DNS Bereiche angegeben (3.1.2.).

3.1.2. Physikalische Karte von pPF3 und pCF1

Nach der Klonierung des chromosomalen DNS Abschnitts von E. coli K12, der die Gene der fhuA Region enthielt, sollten nun die für das Ferrichrom-Fe(III) Aufnahmesystem codierenden Gene dieser Region auf den Plasmiden pCF1 und pPF3 lokalisiert werden. Für die Lokalisierung dieser Gene war es notwendig, die klonierten DNS Abschnitte zunächst in kleinere Einheiten zu unterteilen. Dazu wurden die Orte der spezifischen DNS Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme Bam HI, Cla I,Eco RI, Hind III, Pst I und Sal I der in dem Plasmid pPF3 enthaltenen von pLC4-43 abstammenden Insertion bestimmt (2.2.7.). Die physikalische Karte dieser DNS Insertion erlaubte es dann, da pPF3 und pCF1 teilweise homologe DNS Bereiche enthielten, auch die physikalische Karte von pCF1 aufzustellen.

3.1.2.1. Physikalische Karte von pPF3

Die Bestimmung der Zahl und der Orte der Spaltstellen verschiedener DNS Restriktionsenzyme erfolgte nach Restriktionen von pPF3 mit jeweils einer bestimmten Restriktionsendonuklease (2.2.7.) oder durch Doppelverdau (2.2.8), bei dem pPF3 zunächst mit jeweils einer Endonuklease und dann mit einer zweiten gespalten wurde. Erleichtert wurde die gesamte Analyse dadurch, daß die Restriktionsstellen der verwendeten Enzyme innerhalb des pBR322 DNS Anteils bekannt waren (7).

Die Bestimmung der Molekulargewichte der DNS Fragmente erfolgte nach ihrer Auftrennung im Agarosegel (2.2.3.) durch Vergleich der Wanderungsstrecken der einzelnen Fragmente im Agarosegel mit den Wanderungsstrecken der λ-Eco RI und λ-Hind III Fragmente (2.2.2.). Da bei

manchen Molekulargewichtsbestimmungen gleicher Fragmente verschiedener Agarosegele kleine Differenzen auftraten, sind allen gezeichneten Plasmidkarten nur durchschnittliche und einheitliche Molekulargewichte zugrunde gelegt.

3.1.2.1.1. Pst I und Eco RI Schnittstellen

pPF3 wurde von Pst I in vier Fragmente mit den Größen 4,5 Md, 3,5 Md, 2,85 Md und 0,93 Md gespalten (Abb. 5a und Abb. 6, Gel I, Spur j). Es besitzt also vier Pst I Erkennungssequenzen. Das Fragment mit dem Molekulargewicht von 2,85 Md besteht vollständig aus pBR322 DNS, während die anderen Fragmente die Pst I Insertion von pPF3 darstellen. Der Verdau von pPF3 mit Eco RI lieferte zwei DNS Fragmente mit dem Molekulargewichten von 4,4 Md und 7,6 Md. Das Plasmid pPF3 besaß so zwei Eco RI Schnittstellen, von denen eine innerhalb der pBR322 DNS (Abb. 2) bekannt war. Die Spaltung von pPF3 mit Pst I und mit Eco RI (2.2.8.) ergab nun, daß sich die zweite Eco RI Schnittstelle im 4,5 Md Pst I Fragment befand, und daß dieses Fragment durch Eco RI in zwei Fragmente mit 0,65 Md und 3,85 Md gespalten wurde. Auf Grund der Größe der Fragmente von pPF3 nach Restriktion mit Eco RI, 4,4 Md und 7,6 Md, wurde nun die Lage und die Orientierung des 4,5 Md großen Pst I Fragments in pPF3 bestimmt. Nur wenn dieses Fragment in der Nähe der Eco RI Schnittstelle so integriert war, daß die Eco RI Schnittstelle des 4,5 Md großen Pst I Fragments distal zur pBR322 Eco RI Schnittstelle lag (Abb. 5b), konnte die Größe der gefundenen Eco RI Fragmente erklärt werden. Der Abstand der Eco RI Schnittstelle von pBR322 zur nächsten Pst I Schnittstelle von pBR322 von 0,51 Md und der Abstand bis zur Eco RI Schnittstelle im nachfolgenden 4,5 Md Pst I Fragment von 3,85 Md ergibt dann annähernd genau die Länge des kleineren Eco RI Fragments von 4,4 Md. Wenn man von dem Gesamtmolekulargewicht von pPF3 von

11,75 Md die 4,4 Md des kleineren Eco RI Fragments abzieht, so kommt man mit 7,35 Md annähernd zu der Größe des zweiten Eco RI Fragments, die mit 7,6 Md im Agarosegel bestimmt wurde.

Es war nun zwar die Reihenfolge der 2,85 Md und 4,5 Md Pst I Fragmente und deren Orientierung zueinander geklärt, es blieb aber noch die Anordnung der 0,93 Md Pst I und 3,5 Md Pst I Fragmente nachzuweisen. Dies war durch einen partiellen Verdau von pPF3 mit Pst I möglich.

Beim partiellen Verdau von pPF3 mit Pst I trat als erste zusätzliche Bande oberhalb der pPF3 Pst I Fragmente eine Bande mit 5,5 Md auf. Die Größe dieser Bande konnte nur durch das Vorkommen eines unvollständig verdauten Pst I Fragments, das aus den Pst I Fragmenten mit 4,5 Md und 0,93 Md zusammengesetzt war, erklärt werden. Demnach ist in pPF3, auf Grund der zuvor bestimmten Nachbarschaft der 2,85 Md und 4,5 Md Pst I Fragmente, sowohl das 4,5 Md als auch das 3,5 Md Pst I Fragment dem 0,93 Md Pst I Fragment direkt benachbart (Abb. 5c). Die Reihenfolge der Pst I Fragmente und die Anordnung der Pst I und Eco RI Schnittstellen war aufgeklärt.

3.1.2.1.2. Bestimmung der Bam HI, Hind III, Cla I und Sal I Schnittstellen

Durch Behandlung von pPF3 mit den Restriktionsendonukleasen Bam HI und Hind III wurde festgestellt, daß pPF3 neben der Erkennungsregion dieser Enzyme im Tetracyclinresistenzbereich von pBR322 (Abb. 2) nur noch jeweils eine Schnittstelle für diese Enzyme im pBR322 Insert besitzt. Diese Schnittstelle befand sich sowohl für Bam HI als auch für Hind III im 4,5 Md großen Pst I Fragment. Bam HI spaltete dieses Fragment in einem Bam HI - Pst I Doppelverdau (2.2.8) in Fragmente mit 2,85 Md und 1,65 Md. Bei einem Bam HI - Eco RI Doppelverdau (2.2.8) entstand, neben drei anderen Fragmenten, die auf Grund der Anordnung der schon bekannten Schnittstellen von

pPF3 leicht zu erklären waren, ein DNS Fragment mit einem Molekulargewicht von 1 Md. Dieses Bruchstück stellte das DNS Fragment zwischen der Bam HI und Eco RI Schnittstelle innerhalb des 4,5 Md Pst I Bruchstücks von pPF3 dar.

Die Hind III Schnittstelle konnte nach Pst I -Hind III und Bam HI - Hind III Doppelrestriktionen (2.2.8) auch innerhalb des 4,5 Md Pst I Fragments von pPF3 lokalisiert werden. Sie lag zwischen der Eco RI und Bam HI Schnittstelle 1,15 Md vom nächsten Pst I Ende dieses Fragments entfernt (Abb. 5d).

Durch die Restriktionsendonuklease Cla I wurde pPF3 in drei Fragmente gespalten, deren Größe in dem abgebildeten Agarosegel mit 7,8, 3,9 und 0,34 Md bestimmt wurde (Abb. 6; Gel I, n). Später stellte sich heraus, daß es sich bei der DNS Bande mit 0,34 Md wahrscheinlich um eine Doppelbande handelte, die aus zwei verschiedenen Fragmenten gleicher Größe bestand. Die Summe der Molekulargewichte dieser vier Cla I Fragmente war etwas grösser als das Molekulargewicht von pPF3. Dies beruhte darauf, daß die anhand der Eichkurve bestimmten Molekulargewichte umso ungenauer waren, je größer die untersuchten DNS Fragmente waren.

Eine der vier Cla I Schnittstellen von pPF3 befand sich im pBR322 DNS Anteil und zwar zwischen der Eco RI und Hind III Schnittstelle (Abb. 2). Die anderen vermuteten drei Cla I Schnittstellen wurden nun nach einem Cla I - Pst I Doppelverdau (2.2.8.) im 4,5 Md großen Pst I Fragment lokalisiert. Diese drei Cla I Schnittstellen waren innerhalb des Pst I Fragments wahrscheinlich unmittelbar benachbart, derart, daß durch Cla I - Eco RI und Cla I - Hind III Doppelverdau jeweils eines der Cla I Fragmente gespalten wurde, während das andere noch intakt blieb (Abb. 6, Gel I, b, c, d). Nur der Cla I - Bam HI Doppelverdau ließ diese 0,34 Md Cla I Fragmente unberührt. Nachdem beim Cla I - Pst I Doppelverdau mit Sicherheit

festgestellt wurde, daß die direkt der Pst I Schnittstelle benachbarte Cla I Schnittstelle 0,5 Md von dieser Pst I Schnittstelle entfernt lag, war wenigstens die Anordnung von zwei Cla I Schnittstellen im 4,5 Md Pst I Fragment festgestellt (Abb. 5 e). Die vermutete dritte Schnittstelle dieses Fragments würde dann zwischen der Hind III und Bam HI Schnittstelle liegen. Die pPF3 Sal I Fragmente wurden beim hier abgebildeten Agarosegel mit 3,5 Md, 2,0 Md, 1,6 Md und 1,2 Md bestimmt(Abb. 6; Gel I, 1). Eine der fünf Sal I Schnittstellen von pPF3 lag innerhalb der Tetracyclin Resistenzregion von pBR322 (Abb. 2), und war somit bekannt. Der pPF3 Pst I - Sal I Doppelverdau (2.2.8.) von pPF3 zeigte (Abb. 6; Gel I,k), daß nur das 0,93 Md Pst I Fragment (Abb. 6, I,h) von Sal I nicht gespalten wurde. Sowohl das 3,5 als auch das 4,5 Md Pst I Fragment enthielten daher ein oder mehrere Sal I Schnittstellen.

Diese Sal I Schnittstellen konnten mit Hilfe eines Pst I - Sal I Doppelverdaus von pPT14 (Abb. 6; Gel II, d), das nur das 3,5 Md große Pst I Fragment in der Pst I Schnittstelle von pBR322 integriert enthielt (Abb. 6; Gel II, e), den 3,5 Md und 4,5 Md Pst I Fragmenten von pPF3 zugeordnet werden. pPT14 wurde im Pst I - Sal I Doppelverdau in sechs Fragmente gespalten; vier dieser Fragmente, die mit 0,2 Md, 0,5 Md, 1,2 Md und 1,6 Md im abgebildeten Agarosegel bestimmt wurden (Abb. 6; Gel II, d), waren dem 3,5 Md Pst I Fragment zuzuordnen, während die Fragmente mit 1,9 und 0,9 Md das pBR322 Pst I Fragment ergaben. Die gleichen Fragmente entstanden auch beim pPF3 Pst I - Sal I Doppelverdau (Abb. 6; Gel II, b). Es war bewiesen, daß sich im 4,5 Md Pst I Fragment von pPF3 nur eine Sal I Schnittstelle befand, während im 3,5 Md Pst I Fragment drei Sal I Erkennungssequenzen vorlagen.

Mit Hilfe der Daten des vollständigen Sal I Verdaus von pPF3, der Spaltung des 4,5 Md großen Pst I Fragments in

zwei Fragmente mit 1,9 und 2,6 Md im Pst I - Sal I Doppelverdau und der Spaltung des 3,5 Md Pst I Fragments in Fragmente mit 0,45 Md, 1,25 Md, 1,65 Md und 0,15 Md (standartisierte Werte) waren die Orte aller Sal I Schnittstellen, außer der zentralen Sal I Schnittstelle im 3,5 Md Pst I Fragment berechenbar (Abb. 5, e).

Die Lage dieser zentralen Sal I Schnittstelle zeigte sich nach einem vollständigen Pst I Verdau mit nachfolgendem partiellen Sal I Verdau von pPF3 (2.2.8.). Dabei traten partiell mit Sal I verdaute Pst I Fragmente auf, die manchmal auf Grund mehrerer Kombinationen zustande gekommen sein konnten. Ein mit 1,75 Md bestimmtes, partiell verdautes Fragment konnte entweder nur aus dem 0,15 Md Sal I - Pst I Fragment und dem 1,65 Md Sal I Fragment des 3,5 Md Pst I Fragments zusammengesetzt sein oder aus den 0,45 Md und 1,25 Md Fragmenten des Pst I Fragments von pPF3. Beide Möglichkeiten waren gegeben, wenn das 1,25 Md Sal I Fragment von pPF3 direkt dem 0,93 Md Pst I Fragment im Abstand von 0,45 Md benachbart war (Abb. 5, f).

3.1.2.2. Physikalische Karte von pCF1

Das Ampicillin Resistenzplasmid pCF1 konnte mit Cla I in zwei DNS Fragmente gespalten werden (Abb. 6; Gel I, e). Das kleinere Fragment stellte die pBR322 DNS dar, während das größere Fragment von pLC4-43 abstammte.

pLC4-43 bestand aus 7 Pst I Fragmenten (Abb. 6; Gel I, h) mit Molekulargewichten von 4,5, 3,6, 3,5, 1,35, 0,93, 0,75 und 0,62 Md (standartisierte Werte). Bei einem Cla I-Pst I Doppelverdau (2.2.8.) von pLC4-43 stellte sich heraus, daß das 4,5 Md Pst I Fragment durch Cla I gespalten wurde (siehe 3.1.2.1.2. und Abb. 5, e und f) und daß sich das 3,6 Md große Pst I Fragment aufspaltete in DNS Fragmente mit 1,85 Md und 1,75 Md. Der pCF1 Cla I - Pst I Doppelverdau (Abb. 6; Gel I, f) ergab, daß pGF1 die pLC4-43 Pst I Fragmente mit 3,5 Md, 1,35 Md, 0,93 Md und 0,75 Md vollständig enthielt. Diese Pst I Fragmente waren im DNS Insert

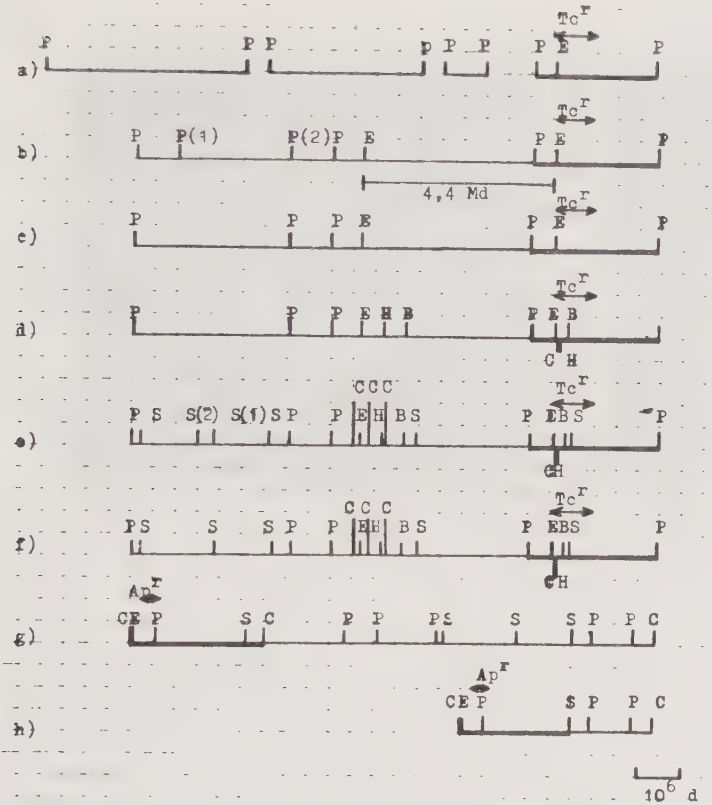


Abb. 5: Aufstellung der physikalischen Karte von pPF3 (a) bis f)) und pCF1 (g) und h)). a) Pst I Fragmente von pPF3; b) Bestimmung der Eco RI Schnittstelle im 4,5 Md Pst I Fragment und Anordnung der Pst I Schnittstellen in pPF3 — P(1) und P(2) geben zwei mögliche Anordnungen einer Schnittstelle wieder; c) nachgewiesene Anordnung der Pst I Fragmente von pPF3; d) Bestimmung der Bam HI und Hind III Schnittstellen von pPF3 — S(1) und S(2) geben die zwei möglichen Orte einer Sal I Schnittstelle an; f) endgültig bestimmte Anordnung der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme von pPF3; g) Anordnung der Restriktionsstellen für Cla I, Pst I, Eco RI und Sal I im Plasmid pCF1, die zum Teil abgeleitet ist von der der Anordnung der Restriktionsstellen im pCF1 Abömmling pCF1/V3 (h).
Dick gezogene Linien bezeichnen den DNS Anteil des Vektors pBR322. Ap^r und Tc^r stehen für die intakten Resistenzregionen dieser Plasmide. Abkürzungen für die Restriktionsenzyme: B = Bam H I, C = Cla I, E = Eco RI, H = Hind III und P = Pst I.

von pBR322 von einem 0,5 Md und einem 1,85 Md Cla I - Pst I Fragment flankiert. Das Fragment mit 0,5 Md stellte den Rest des 4,5 Md Pst I Fragments von pLC4-43 oder pPF3 dar (Abb. 5, f). Es wurde nun angenommen, daß dieses Fragment wie in pPF3 auch in pCF1 dem 0,93 Md und 3,5 Md Pst I Fragment benachbart war. Diesen Fragmenten folgten dann die 1,35 und 0,75 Md Pst I Fragmente und schließlich das 1,85 Md Pst I - Cla I Fragment, welches das pBR322 Insert abschloß (Abb. 5, g). Die Nachbarschaft des 0,75 Md Pst I Fragments mit dem 1,85 Md Cla I - Pst I Fragment war dadurch vorgegeben, daß das 1,85 Md Cla I - Pst I Fragment als Teil des 3,6 Md pLC4-43 Fragments zum größten Teil aus ColE1 DNS bestehen mußte. Das 0,75 Md Pst I Fragment von pLC4-43 stellte aber das ColE1 Pst I Fragment mit einem Molekulargewicht von 0,75 - 0,8 Md dar (6), das nach der Konstruktion der pLC Plasmide mit der "Poly A - Poly T" Methode (20, 21) immer noch mit der übrigen ColEI DNS gekoppelt war.

Das Plasmid pCF1 enthielt im pBR322 DNS Insert keine weiteren Sal I Schnittstellen als pPF3. Da pCF1 später (3.1. 3.1.) durch partiellen Sal I Verdau so verkleinert werden konnte, daß das pBR322 Insert bei pCF1/V3 (Abb. 5, h) sich nur noch aus dem 0,5 Md Cla I - Pst I, dem 0,93 Md Pst I Fragment und dem 0,45 Md Pst I - Sal I Fragment bestand, war die Orientierung des großen Cla I Fragments bei pCF1 auch nachgewiesen (Abb. 5, g).

Gel I: a b c d e f g h i j k l m n Gel II: a b c d e f

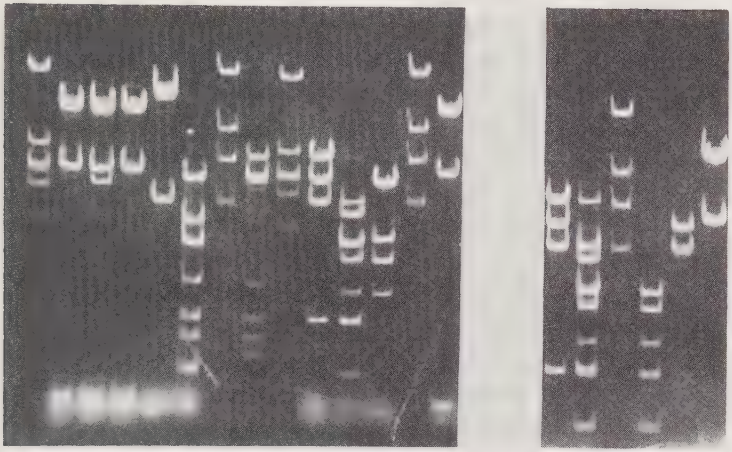


Abb. 6: Elektrophoretische Auftrennung von Plasmidfragmenten nach dem Verdau mit einer oder zwei Restriktionsendonukleasen im Agarosegel (0,7 %). Gel I: a) λ-Eco RI Fragmente; b) pPF3 Cla I - Eco RI Doppelverdau; c) pPF3 Cla I - Bam HI; d) pPF3 Cla I - Hind III; e) pCF1 Cla I; f) pCF1 Cla I - Pst I; g) λ-Hind III; h) pLC4-43 Pst I; i) λ-Eco R I; j) pPF3 Pst I; k) pPF3 Pst I - Sal I; l) pPF3 Sal I; m) λ-Hind III; n) pPF3 Cla I; (zu b) und d): In dieser Abbildung ist die Eco R I oder Hind III Spaltung von jeweils einem der vermuteten zwei 0,34 Md Cla I Fragmente wegen der in diesem Bereich laufenden RNS Verunreinigung kaum zu erkennen).
Gel II: a) pPF3 Pst I; b) pPF3 Pst I - Sal I; c) λ-Hind III; d) pPT14 Pst I - Sal I; e) pPT14 Pst I; f) pPF3 Cla I - Eco RI. Die Molekulargewichte der λ-Hind III und λ-Eco RI Fragmente und deren Wanderungsstrecken im Agarosegel ergaben eine Eichgerade an der auch die Molekulargewichte der übrigen Fragmente bestimmt werden konnten.

3.1.3. Isolierung von Deletionsplasmiden und Tn*5* Insertionsplasmiden

Die Plasmide pPF3 und pCF1 (Abb. 5, f und g) konnten die Mutation im *fhu* Genbereich von H416 *fhuA*13 sowohl zur T5 Sensitivität als auch zur Albomycin Sensitivität und zum Wachstum mit Ferrichrom und Rhodothorulasäure komplementieren (Tab. 1). Das Komplementationsergebnis mit pPT14, das nur das 3,5 Md Pst I Fragment mit dem *fhuA* Gen von pLC4-43 in pBR322 integriert enthielt, zeigte, daß die

Komplementation zur Albomycin Sensitivität und zum Wachstum mit Ferrichrom nur dann erfolgen konnte, wenn das Plasmid wie im Fall von pCF1 und pPF3 noch das 0,93 Md Pst I Fragment und das 0,5 Md Pst I - Cla I Fragment enthielt, das bei pCF1 den in pBR322 inserierten DNS Anteil abschloß. Sowohl pPF3 als auch pCF1 besaßen aber, in pBR322 inseriert, noch DNS Anteile, die für das Ferrichromaufnahmesystem und zur Komplementation von H416 fhuA13 nicht notwendig waren.

Zunächst wurden diese Plasmide durch Eco RI Verdau beziehungsweise durch partiellen Sal I Verdau und Religation verkleinert. Die Verkleinerungsformen pPF3/V1 und pCF1/V1 standen dann zusammen mit den ursprünglichen Plasmiden zu Verfügung, um durch die Isolierung von Deletionsplasmiden und Tn5 Insertionsplasmiden näheres über die Lokalisierung der Gene für das Ferrichrom Fe(III)-Aufnahmesystem der fhu Region zu erfahren.

Bei der Selektion von Deletionsplasmiden und Tn5 Insertionsplasmiden verwendete man neben dem Stamm H416 fhuA13 noch weitere Stämme, die meistens auf Grund ihrer Albomycin Resistenz selektioniert wurden (2.2.12.). Diese Mutationen konnten in Komplementationsstudien (3.2.) mit Plasmiden, deren Isolierung nachfolgend beschrieben ist, entweder der DNS Region zugeordnet werden, die direkt dem fhuA Gen benachbart ist (fhuC Mutation) oder einer etwas weiter vom fhuA Gen entfernten Region (fhuB Mutation). Mit Hilfe von diesen Mutantenstämmen konnten weitere Deletionen in den komplementären Plasmidbereichen vor allem bei pPF3 und pPF3/V1 gefunden werden.

3.1.3.1. Verkleinerung von pPF3 mit Eco RI und von pCF1 mit partiellem Sal I Verdau

Das Tetracyclin Resistenzplasmid pPF3 besitzt zwei Eco RI Schnittstellen (Abb. 7, a), von denen eine im 4,5 Md Pst I Fragment und die andere im pBR322 Pst I Fragment lokalisiert ist. Die Eco RI Schnittstelle im pBR322

Anteil betrifft nicht die Tetracyclin Resistenzregion (63). Beide Schnittstellen schließen ein DNS Bruchstück mit 4,5 Md ein.

Isoliertes und CsCl-gereinigtes pPF3 (2.2.1.) wurde vollständig mit Eco RI gespalten und die Fragmente durch Behandlung mit T4 DNS-Ligase wieder miteinander verknüpft (2.2.7.). Das so behandelte DNS Gemisch wurde dann zur Transformation (2.2.4.) von H416 fhuA13 verwendet. Die Transformanten wurden auf die Selektionsplatten ausplattiert, die nur das Wachstum von Fe(III)-Ferrichrom verwertenden, Tetracyclin resistenten Bakterienklonen erlaubten (2.2.4.). Nach drei Tagen Inkubation der Platten bei 37 °C wurden die auf den Agarplatten zahlreich aber langsam gewachsenen Kolonien vereinzelt. Aus Einzelkolonien verschiedener Klone wurde dann im Miniscreen (2.2.1.) die Plasmid DNS isoliert und durch Pst I Verdau analysiert.

Die meisten Transformantenklone enthielten ein kleineres Plasmid als pPF3, das durch die Excision des kleineren Eco RI Fragments und durch Religation entstanden war (Abb. 7, b). Dieses Plasmid, das mit pPF3/V1 bezeichnet wurde, komplementierte den Stamm H416 fhuA13 genauso wie pPF3 (Tab. 2).

Im Vergleich zu pPF3 enthält das Ampicillin Resistenzplasmid pCF1 im pBR322 Insert auf der anderen Seite des 3,5 Md Pst I Fragments noch DNS, die nicht für das Ferrichrom Aufnahmesystem codiert. Von Hirota und seinen Mitarbeitern wurde festgestellt, daß in diesem Bereich das Gen für das Penicillin-Bindeprotein 1b liegt, das sich bis in das 3,5 Md Pst I Fragment erstreckt (75).

Es wurde nun versucht durch partiellen Verdau von pCF1 mit Sal I und anschließender Religation, ausgehend von der Sal I Schnittstelle im Tetracyclin Resistenzbereich von pBR322, Deletionen zu erzeugen, die sich bis zu den Sal I Schnittstellen der inserierten pLC4-43 DNS erstreckten. Diese Deletionsplasmide wurden nach Trans-

formation (2.2.4.) der partiell mit Sal I gespaltenen und religierten pCF1 DNS in H416 fhuA13 aus Transformantenklonen isoliert, die auf TY-Ampicillin Agarplatten gewachsen waren.

Aus einem T5 sensitiven Transformantenklon wurde ein Plasmid isoliert, dem das 4,5 Md Sal I Fragment fehlte, während aus T5 resistenten Klonen entweder Plasmide isoliert wurden, denen das 4,5 Md Sal I Fragment und das 1,65 Md Sal I Fragment oder noch zusätzlich das 1,25 Md Sal I Fragment von pCF1 fehlte (Abb. 7, c, d, e,). Diese Plasmide bezeichnete man mit pCF1/V1 (Deletion von 4,5 Md), pCF1/V2 (Deletion von 4,5 und 1,65 Md) und pCF1/V3 (Deletion von 4,5, 1,65 und 1,25 Md). Da zu diesem Zeitpunkt die Orientierung des DNS Inserts bei pCF1 in pBR322 noch nicht nachgewiesen war, konnte nach der Isolierung dieser Sal I Verkleinerungsformen auf Grund der Art der Sal I Deletionen eine Orientierung (Abb. 5, g) bestätigt werden.

pCF1/V1 konnte den Stamm H416 fhuA13 noch genauso zur T5 Sensitivität, Albomycin Sensitivität und zum Wachstum mit Ferrichrom und Rhodothorulasäure komplementieren wie pCF1. Dagegen waren pCF1/V2 und pCF1/V3 zu diesen phänotypischen Komplementationen nicht mehr in der Lage (Tab.2).

3.1.3.2. Tn5 Insertionsplasmide und Verkleinerung von Tn5 Insertionsplasmiden durch Behandlung mit Xho I

Der Stamm H508 enthält das Transposon Tn5 (4, 66) in einem der chromosomalen Gene für die Methioninbiosynthese. Er wurde verwendet, um Tn5 Insertionen in dem DNS Bereich der Plasmide pCF1, pCF1/V1, pPF3 und pPF3/V1 (Abb. 7) zu erhalten (27), der für das Ferrichrom Aufnahmesystem codiert.

Tn5 Insertionen im fhuA Gen der Plasmide konnten bei pPF3, pPF3/V1, pCF1 und pCF1/V1 erhalten werden, nachdem diese Plasmide in eine fhuA Mutante von H508 trans-

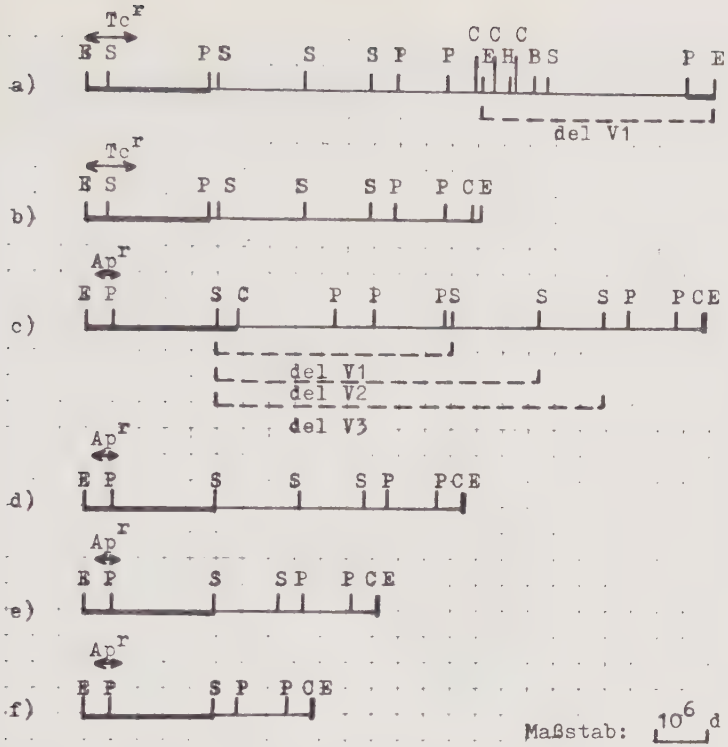


Abb. 7: Selektionierte Verkleinerungsformen der Plasmide pPF3 (a und b) und pCF1 (d bis e). a) pPF3; b) pPF3/V1 (Deletion von einem Eco RI Fragment von pPF3); c) pCF1; d) pCF1/V1 (Deletion von einem Sal I Fragment von pCF1); e) pCF1/V2 (Deletion von zwei Sal I Fragmenten von pCF1); f) pCF1/V3 (Deletion von drei Sal I Fragmenten von pCF1). Die Plasmide sind linear dargestellt, geöffnet an der Eco RI Schnittstelle der pBR322 DNS. Die dick gezogene Linie kennzeichnet die Vektor DNS. Die Bereiche, die für Ampicillin und Tetracyclinresistenz codieren, sind eingezeichnet (Ap^r und Tc^r). C, B, E, H, P und S bezeichnen die Schnittstellen der DNS Restriktionsenzyme (siehe Abb. 5).

formiert wurden. Es wurden dann solche Klone selektioniert, die auf Grund der Integration von Tn*5* in die betreffenden "multi copy" Plasmide (7) wegen des Gen-Dosis Effekts gegen höhere Neomycinsulfat-Dosen resistent waren als die übrigen Transformanten, und die wegen der Tn*5* Insertion im *fhuA* Gen der Plasmide auch noch T5 und Albomycin

Tab. 2: Test von H416 fhuA13 Transformanten mit pPF3 und pCF1 und mit den zunächst isolierten Deletionsplasmiden auf T5 und Albomycin Sensitivität und auf Wachstum mit Hilfe von Ferrichrom und Rhodothorulasäure bei Eisenmangelbedingungen (2.2.5.).

Stamm H416 fhuA13 transformiert mit	Sensitivität gegenüber T5	Albomycin	Wachstum mit Ferrichrom	Rhodothorulasäure
0	-	-	-	-
pPF3/V1	+	+	++	+
pCF1	+	+	++	+
pCF1/V1	+	+	++	+
pCF1/V2	-	-	-	+
pCF1/V3	-	-	-	-

Erläuterung: Sensitivitätstest: - bedeutet Resistenz; + bedeutet Sensitivität. Wachstumstest: - bedeutet: kein Wachstumshof um die Filterrondelle; +, ++: gut oder sehr gut ausgeprägter Wachstumshof um die mit dem Eisenkomplexbildner getränkte Filterrondelle.

resistent waren (27, Abb. 8). Die Tn5 Insertionsplasmide mit Tn5 Insertionen in fhuA wurden abkürzend mit pTN1 bis pTN10 bezeichnet.

Es konnten auch Tn5 Insertionsplasmide von pPF3/V1 und pCF1/V1 isoliert werden, bei denen Tn5 in der Nachbarschaft von fhuA integriert war. Auf Grund dieser Tn5 Insertionen konnten die Plasmide pPF3/V1 und pCF1/V1 eine Albomycin resistente und T5 sensitive Mutante des Stamms H508, die durch pPF3/V1 und pCF1/V1 noch vollständig zur T5 Sensitivität komplementiert wurde, nicht mehr zum Wildtypphänotyp komplementieren (27). Dies war nur dadurch zu erklären, daß die Tn5 Insertionen ein oder mehrere Gene inaktivierten, die fhuA benachbart waren, und die für die weiteren Ferrichrom-Aufnahmekomponenten des Aufnahmesystems in der Cytoplasmamembran codierten (16, 41). Diese Insertionsplasmide bezeichnete man, wenn es sich um Tn5 Insertionen in pCF1/V1 handelte, mit pFB1

bis pFB7 und, wenn es sich um Tn5 Insertionen in pPF3/V1 handelte, mit pFB101 bis pFB103.

Wie der allen Plasmiden mit Tn5 Insertionen gemeinsame Ausschnitt der physikalischen Karte zeigt (27, Abb. 8), erstrecken sich die Tn5 Insertionen in fhuA vom 1,65 Md Sal I Fragment bis weit in das 1,25 Md Sal I Fragment hinein. Die Tn5 Insertionen in dem benachbarten Bereich, die in der entsprechenden Mutante Albomycin Resistenz und T5 Sensitivität bewirken, liegen dagegen in dem DNS Abschnitt von der Mitte des 1,25 Md Sal I Fragments bis zu Beginn des 0,93 Md Pst I Fragments.

Alle Tn5 Insertionen mit Tn5 in fhuA, außer diejenige von pTN4, verursachten in H508 fhuA vollständige T5 Resistenz. Es wurde jedoch später gefunden, daß H507 fhuA1 oder H506 fhuA1 Transformanten mit pTN4 im Querstrichtest genauso wie H508 fhuA Transformanten mit pTN4 schwach sensitiv gegen T5 waren. Alle Tn5 Insertionen in der Nachbarschaft von fhuA wurden in den Stamm H416 fhuA13 transformiert. Alle diese Plasmide komplementierten den Stamm zwar zur T5 Sensitivität, aber kein einziges komplementierte ihn zur Sensitivität gegenüber Albomycin und zum Wachstum mit Hilfe von Ferrichrom und Rhodothorulasäure.

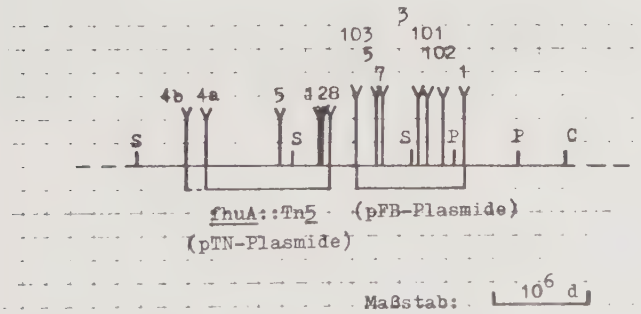


Abb. 8: Physikalische Karte des gemeinsamen Teils der DNS Insertionen in pBR322 bei pPF3, pPF3/V1, pCF1 und pCF1/V1 mit den Angaben der Orte der Tn5 Insertionen bei den entsprechenden Tn5 Insertionsplasmiden. Inser-

tionsplasmide mit Tn5 Insertionen in der Nachbarschaft von fhuA wurden mit pFB bezeichnet. 1: Tn5 Insertionsort von pFB1 und pFB2; 102: Tn5 Insertionsort von pFB102; 101: Tn5 Insertionsort von pFB101; 3: Tn5 Insertionsort von pFB3; 7: Tn5 Insertionsort von pFB7; 5: Tn5 Insertionsort von pFB5 und pFB6; 103: Tn5 Insertionsort von pFB103 (pFB1 bis pFB7 = Tn5 Insertionen in pCF1; pFB101 bis pFB103 = Tn5 Insertionen in pPF3/V1). Insertionsplasmide mit Tn5 in fhuA wurden mit pTN bezeichnet. 8: Tn5 Insertionsort von pTN8; 2: Insertionsort von pTN2; 1: Insertionsort von pTN1, pTN3, pTN7, pTN9 und pTN10; 5: Insertionsort von pTN5; 4a, 4b: zwei Möglichkeiten der Tn5 Insertion von pTN4 (pTN1 = Tn5 Insertion in pPF3; pTN2 und pTN3 = Tn5 Insertion in pPF3/V1; pTN3, pTN4 und pTN5 ≠ Tn5 Insertion in pCF1/V1; pTN7 bis pTN10 = Tn5 Insertion in pCF1).

3.1.3.2.1. Verkleinerung von Tn5 Insertionsplasmiden mit Xho I

Bei der Suche nach den Proteinen, die von pPF3/V1 und pCF1/V1 mit dem fhu Bereich codiert werden, erwiesen sich die von Tn5 codierten Proteine mit Molekulargewichten von 58 K, 54 K, 53 K, 49 K und 26 K (66) bei der Analyse der Minizellproteinauftrennungen (3.3.) als störend. Besonders ungünstig war die starke Markierung der Neomycinphosphotransferase (26 K), die auf den Fluorogrammen einen dicken schwarzen Fleck verursachte. In einem ersten Versuch wurde deshalb versucht, wenigstens einige dieser Tn5 codierten Proteine durch Erzeugung von Deletionen in der Tn5 DNS der Plasmide pTN3, pTN5, pFB1, pFB101, pFB3, pFB5 und pFB103 zu eliminieren.

Die physikalische Karte des Transposons Tn5 (Abb. 10, a) weist drei Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease Xho I auf. Zwei dieser Schnittstellen liegen in den Enden der Tn5 DNS, die gegenläufig komplementär sind. Eine Schnittstelle befindet sich etwa in der Mitte. In den hier verwendeten Agarose-Gelsystemen ergab sich nach der Insertion von Tn5 in ein Plasmid eine Vergrößerung des Molekulargewichts um etwa 3,9 Md. Nach der physikalischen Karte von Tn5 berechneten sich die Xho I Fragmente des Transposons mit 0,32 Md, 1,6 Md, 1,65 Md und 0,32 Md.

Durch Restriktion von Tn*5* Insertionsplasmiden mit Xho I und Religation mit T4 DNS-Ligase könnten leicht beide Tn*5* Xho I Fragmente eliminiert werden, wenn die Plasmide sonst keine zusätzlichen Xho I Schnittstellen mehr hätten. Diese Deletionsplasmide könnten auf Grund des Verlustes des Neomycin Resistenzgens in den Transformantenkolonien auch gefunden werden — man müßte nur solche Transformanten auswählen, die Neomycin sensitiv sind. Bei diesen Versuchen wurde aber festgestellt (2.2.9.1.), daß alle Tn*5* Insertionsplasmide in vier Xho I Fragmente gespalten wurden (Abb. 9, Gel I, a bis h). Sowohl pPF3/V1 als auch pCF1/V1 besaßen also eine Xho I Schnittstelle. Diese Schnittstelle wurde im 0,93 Md Pst I Fragment beider Plasmide lokalisiert (Abb. 10, b bis j) und zwar 0,2 Md von der Pst I Schnittstelle entfernt, die der pBR322 DNS benachbart ist. Es war deshalb anzunehmen, daß bei einem vollständigen Verdau mit Xho I und Religation in den entsprechenden Transformanten hauptsächlich solche Plasmide gefunden werden, die nur noch aus dem größten Xho I Fragment bestehen. Bei diesen Plasmiden würden die Tn*5* Xho I Fragmente mit 1,65 Md und 1,6 Md und das bei den verschiedenen Tn*5* Insertionsplasmiden verschieden große Xho I Fragment, aus Plasmid DNS und einem 0,32 Md großen Tn*5* Ende, fehlen. Dieses variable Fragment wird bei den Tn*5* Insertionsplasmiden von der Xho I Schnittstelle im 0,93 Md Pst I Fragment von pPF3/V1 und pCF1/V1 und der äußeren benachbarten Xho I Schnittstelle der Tn*5* DNS gebildet.

Bei der Suche nach Verkleinerungsformen wurden die Plasmide pTN3, pTN5, pFB1, pFB3, pFB5, pFB101 und pFB103 zunächst jeweils mit Xho I partiell gespalten und dann wieder mit T4 DNS-Ligase verknüpft (2.2.9.1.; Abb. 9, Gel II, A bis N). Die mit Ligase behandelten DNS Proben wurden dann jeweils zur Transformation (2.2.4.) des Minizellproduzenten H506 *fhuA*1 (2.2.13.) verwendet. Die Transformanten wurden auf TY-Ampicillin beziehungsweise TY-

Tetracyclin Agarplatten selektioniert.

Die meisten Plasmide aus den Neomycin sensitiven Transformantenklonen bestanden nur noch aus einem einzigen Xho I Fragment, das auch den Großteil der pBR322 DNS enthielt. Dieser DNS Teil war für die Replikation der Plasmide unbedingt erforderlich. Diese Plasmide (Abb. 10, b bis h, Deletionen III) bezeichnete man nach dem ursprünglichen Tn*5* Insertionsplasmid und nach der Kolonie-Nr., aus der sie isoliert wurden, mit pTN5/2, pTN3/6, pFB103/1, pFB5/6, pFB3/1, pFB101/2, pFB1/3 und pFB101/2.

Nach der Untersuchung der im Miniscreen isolierten Plasmid DNS aus bis zu 40 Neomycin sensitiven Klonen mit den Deletionsplasmiden eines Mutterplasmids, wurden von pFB103, von pFB5, pFB3 und von pFB1 Plasmidabkömmlinge gefunden, denen nur das 1,6 Md Xho I Fragment, mit dem Neomycin Resistenzgen, fehlte. Diese Plasmide bezeichnete man mit pFB103/113, pFB5/101, pFB5/130, pFB3/106, pFB1/1 und pFB103/110 (Abb. 10, b bis h, Deletionen I). Die Orientierung der in diesen Plasmiden verbleibenden beiden kleineren Xho I Fragmente wurde durch die Bestimmung der Pst I Fragmente dieser Plasmide nachgewiesen. Während bei pFB5/101 und pFB5/130 die Orientierung dieser Fragmente identisch ist (Abb. 10, e), ist das restliche Tn*5* Xho I Fragment mit 1,6 Md in pFB103/110 und pFB103/113 (Abb. 10, d) umgekehrt im Vergleich zueinander orientiert.

Schließlich wurden von pTN5, pTN3, pFB103, pFB5, pFB3 pFB1 und pFB101 auch Xho I Deletionsplasmide gefunden, denen das 1,6 Md Xho I Fragment mit der Neomycin Resistenzregion fehlte und zusätzlich noch das Xho I Fragment, das aus Plasmid DNS und T*5* DNS besteht (Abb. 10, b bis h, Deletionen II). Diese Plasmide bezeichnete man mit pTN5/7, pTN3/4, pFB5/5, pFB5/109, pFB5/119, pFB3/2, pFB3/111 und pFB101/2-1. In keinem Fall konnten jedoch Plasmide gefunden werden, denen sowohl das 1,6 Md

als auch das 1,65 Md Xho I Fragment von Tn*5* fehlten.

In einem zweiten Versuchsansatz konnten auch Xho I Deletionsplasmide von pFB101 und pFB102 selektioniert werden. Hierbei wurde jedoch nach partiellem Verdau und Ligase-Behandlung die Plasmid DNS jeweils in die auf Grund ihrer Albomycin Resistenz isolierten Mutante H506 r^-m^- *fepA*1/2 Ar6 transformiert (3.2.4.). Diese T5 sensitive und Albomycin resistente Mutante konnte von pFB101 und pFB102 dann zur Albomycin Sensitivität komplementiert werden, wenn der DNS Bereich von der Tn*5* Insertion über das 0,93 Md Pst I Fragment bis zur pBR322 DNS intakt war (*fhuB* Mutation, 3.2.4.). So konnten aus Neomycin und Albomycin sensitiven Transformantenklonen direkt die Plasmide

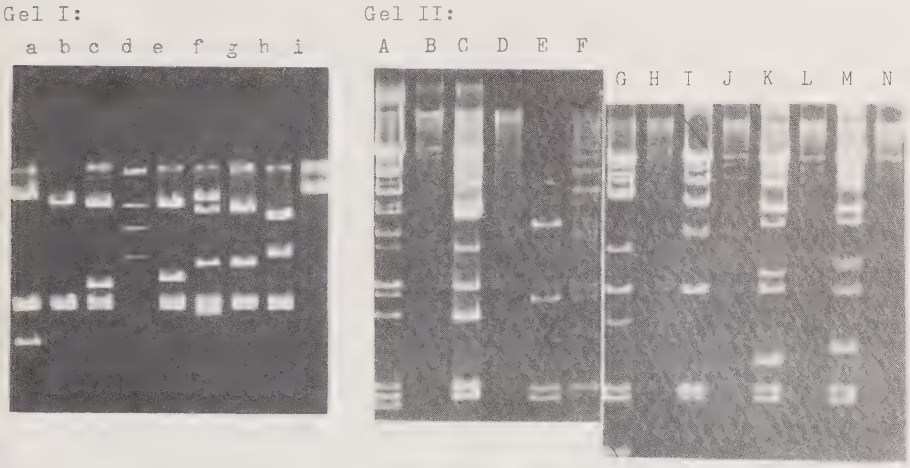
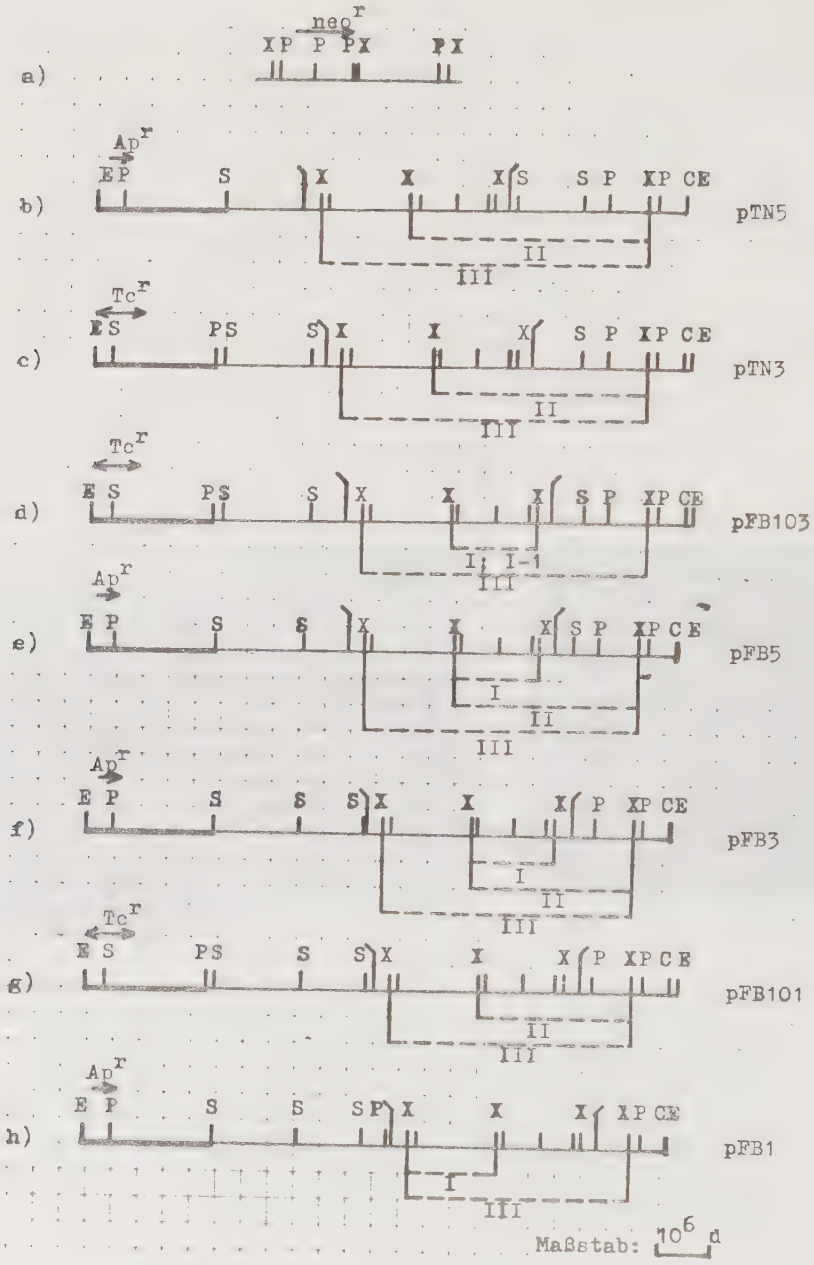


Abb. 9: Auftrennung von Xho I Plasmidfragmenten vor und nach Behandlung mit T4 DNS-Ligase im Agarosegel (0,6 %). Gel I: a) pFB1 Xho I; b) pFB3 Xho I; c) pFB5 Xho I; d) λ-DNS Hind III; e) pFB103 Xho I; f) pFB101 und pTN3-Xho I; g) pTN3 Xho I; h) pTN5 Xho I; i) pPF3/V1 Xho I. Gel II: A) pFB101 und pTN3 - Xho I; B) wie A), nach Ligation; C) pTN3 Xho I; D) wie C), nach Ligation; E) pTN5 Xho I; F) wie E), nach Ligation; G) pFB1 Xho I; H) wie G), nach Ligation; I)pFB3 Xho I; J) wie I, nach Ligation; K) pFB5 Xho I; L) wie K), nach Ligation; M) pFB103 Xho I; N) wie M), nach Ligation.


neo r
X P P P X P X
a)
Ap r
E P S X X X S S P X P C E
b)
II
III
pTN5
Tc r
E S P S X X X S P X P C E
c)
II
III
pTN3
Tc r
E S P S X X X S P X P C E
d)
I; I-1
III
pFB103
Ap r
E P S S X X X S P X P C E
e)
I
II
III
pFB5
Ap r
E P S S S X X X P X P C E
f)
I
II
III
pFB3
Tc r
E S P S S S X X X P X P C E
g)
II
III
pFB101
Ap r
E P S S S P X X X X P C E
h)
I
III
pFB1
Maßstab: 10 6 d

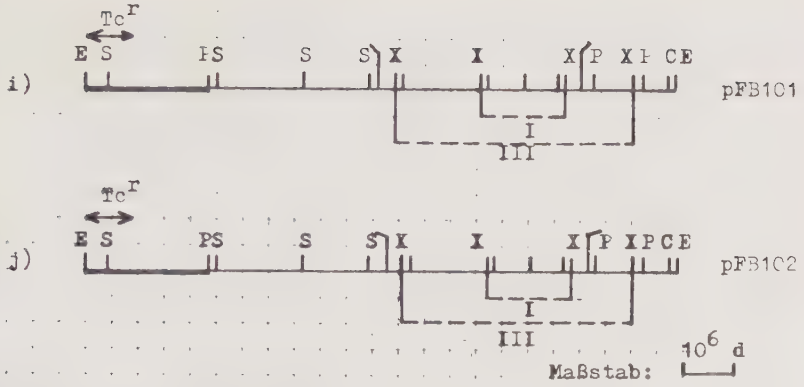


Abb. 10: Physikalische Karten der isolierten Tn5 Insertionsplasmide und deren Xho I Deletionsformen. Bei den Abbildungen b) bis h) wurde die Orientierung der Tn5 Xho I Fragmente nur bei den Deletionsplasmiden durch Pst I Verdau bestimmt und nicht wie eingezeichnet bei den ursprünglichen Plasmiden. Das restliche 1,65 Md Xho I Fragment bei den Deletionen I und II ist in den Deletionsplasmiden mit Ausnahme bei der Deletion Abb. d), Deletion I-1, so orientiert wie eingezeichnet. Bei der Deletion I-1 des Plasmids pFB103/110 (Abb. d) ist dieses Fragment aber gerade umgekehrt orientiert wie gezeichnet. Bei den Abbildungen i) und j) wurde die Orientierung der verbleibenden Tn5 Xho I Fragmente bei den Deletionsplasmiden nicht bestimmt. Das Ausmaß der Deletionen wurde hier durch Xho I und Sal I Verdau nachgewiesen. a) Tn5 DNS mit Pst I (P) und Xho I (X) Schnittstellen; b) pTN5 Deletionen: II bei pTN5/7, III bei pTN5/2; c) pTN3 Deletionen: II bei pTN3/4, III bei pTN3/6; d) pFB103 Deletionen: I bei pFB103/113, I-1 bei pFB103/110, III bei pFB103/1; e) pFB5 Deletionen: I bei pFB5/101 und pFB5/130, II bei pFB5/5, pFB5/119 und pFB5/109, III bei pFB5/6; f) pFB3 Deletionen: I bei pFB3/106, II bei pFB3/2, pFB3/109 und pFB3/111, III bei pFB3/1; g) pFB101 Deletionen: II bei pFB101/2-1, III bei pFB101/2; h) pFB1 Deletionen: I bei pFB1/1; III bei pFB1/3; i) und j) stellen Deletionsplasmide dar, die in H506 r⁻m⁻ fepA1/2 Ar6 selektioniert wurden. i) pFB101 Deletionen: I bei pFB101/50; III bei pFB101/55; j) pFB102 Deletionen: I bei pFB102/50, III bei pFB102/55. Neo^r = Gen für die Neomycinphosphotransferase. Sonstige Abkürzungen und Plasmiddarstellung siehe Abb. 5 und 7. Bei den Tn5 Insertionsplasmiden wurden innerhalb der Tn5 DNS die Xho I und Pst I Schnittstellen eingezeichnet. Es wurden aber nur die Xho I Schnittstellen benannt.

pFB101/50 und pFB102/50 isoliert werden, denen nur das 1,6 Md Xho I Fragment des Transposons Tn*5* fehlte (Abb. 10, i, j, Deletionen I). Dagegen wurden aus Neomycin sensitiven und Albomycin resistenten Kolonien solche Xho I Deletionsplasmide isoliert, die nur noch aus dem großen Xho I Fragment der Ursprungsplasmide bestanden und die mit pFB101/55 und mit pFB102/55 bezeichnet wurden (Abb. 10, i, j, Deletionen III). Diese Plasmide waren wegen der Deletion bis zur Xho I Schnittstelle im 0,93 Md Pst I Fragment nicht mehr in der Lage die Ar6 Mutation des Transformantenklons zu komplementieren.

3.1.3.2.2. Integration der Tn*5* Insertion von pFB5/101 in das Tetracyclin Resistenzplasmid pPF3/V1

Der Rest des Transposons Tn*5* inaktiviert bei pFB5/101 ein Gen, das *fhuA* benachbart ist und das notwendig für die Fe(III)-Aufnahme mittels Ferrichrom und für die Albomycin Sensitivität der *E. coli* Zelle ist (3.2.4.). Es wurde festgestellt, daß dieses Gen ein 30 K Protein codiert (3.3.1.1.3.). Um im Minizellsystem ein eventuell von pFB5/101 noch codiertes und synthetisiertes unvollständiges 30 K Protein nachzuweisen, wurde das Sal I Fragment mit dem Rest der Tn*5* Insertion von pFB5/101 (Abb. 11) an die Stelle des entsprechenden Sal I Fragments von pPF3/V1 gesetzt. Ein solches Plasmid codiert im Gegensatz zu pCF1/V1 und dessen Abkömmlingen keine ß-Laktamase, die auf dem Fluorogramm der Auftrennung der markierten Minizellproteine einen großen schwarzen Fleck verursachte, der ein unvollständiges 30 K Protein verdecken könnte.

Für den Transfer des Sal I Fragments von pFB5/101 mit dem Rest der Tn*5* Insertion (Abb. 11, a) an die Stelle des entsprechenden Sal I Fragments von pPF3/V1 wurde im CsCl-Gradienten gereinigte pFB5/101 DNS mit Sal I gespalten und mit partiell Sal I gespaltener pPF3/V1 DNS ligiert. Das Ligasegemisch wurde in den Stamm H416

fhuA13 transformiert. Es wurden Tetracyclin resistente Transformanten, die auf TY-Tetracyclin Agarplatten gewachsen waren, auf T5 und Albomycin Sensotivität getestet. Das gesuchte Plasmid mußte in einem T5 sensitiven und Albomycin resistenten Transformantenklon gefunden werden. Die T5 Sensitivität dieses Klons wurde postuliert weil, wie bei der Isolierung von Tn5 Insertionsplasmiden festgestellt wurde, das fhuA Gen sich etwa von der Mitte des 1,65 Md Sal I Fragments bis in das benachbarte 1,25 Md Sal I Fragment der Plasmide pCF1/V1 und pPF3/V1 erstreckt (3.1.3.2.1.). Wenn also bei der Ligation das 1,25 Md Sal I Fragment, das bei pFB5/101 noch den Rest der Tn5 Insertion enthält, in ein pPF3/V1 Fragment, dem das eigene 1,25 Md Sal I Fragment herausgeschnitten wurde, in der richtigen Orientierung inseriert würde, dann käme es zur Rekonstituierung des fhuA Gens und damit zur Komplementierung zur T5 Sensitivität. Gleichzeitig wären solche H416 fhuA13 Transformanten aber Albomycin resistent, da ihr Plasmid in der Nachbarschaft von fhuA den Rest der Tn5 Insertion von pFB5/101 an der entsprechenden Stelle von pPF3/V1 tragen würde.

Bei diesem Versuch wurde unter 200 Tetracyclin resistenten Transformantenklonen ein Klon gefunden, der T5 sensitiv und Albomycin resistent war und der tatsächlich, wie die Restriktionsanalyse mit Pst I und Sal I zeigte, ein pPF3/V1 Abkömmling enthielt, der das Sal I Fragment mit dem Rest der Tn5 Insertion von pFB5/101 in der richtigen Orientierung an der Stelle des 1,25 Md Sal I Fragments von pPF3/V1 enthielt (Abb. 11, a; Minizellanalyse: 3.3.1.2.3.). Dieses Plasmid bezeichnete man mit pFB500/101.

In einem Parallelversuch gelang es auch, nach partiellem Sal I Verdau von pFB5 und pPF3/V1 und Religation, in einem entsprechenden H416 fhuA13 Tetracyclin resistenten Transformantenklon eine pPF3/V1 Plasmidvariante zu iso-

lieren, die anstelle des 1,25 Md Sal I Fragments von pPF3/V1 das entsprechende Fragment von pFB5 mit der gesamten Tn5 Insertion in der richtigen Orientierung enthielt. Dieses Plasmid, das mit pFB505 bezeichnet wurde (Abb. 11, b), verursachte in H416 fhuA13 Albomycin und Neomycinsulfat Resistenz und T5 Sensitivität. Die richtige Orientierung des inserierten Fragments und die physikalische Karte wurden durch Restriktion von pFB505 mit Sal I nachgewiesen.

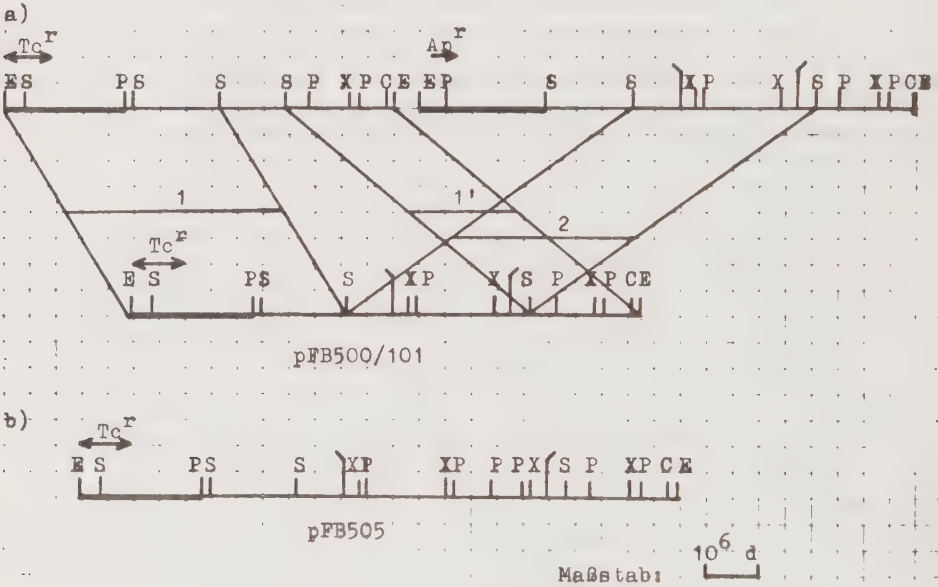


Abb. 11: Konstruktion von pFB500/101 (Abb. 11, a) durch die Ligation zweier Sal I Fragmente von pPF3/V1 (1 und 1') und eines Sal I Fragments von pFB5/101 (2). b) Physikalische Karte des Plasmids pFB505, das durch Ligation eines partiell geschnittenen pPF3/V1 Sal I Fragments mit einem partiell geschnittenen pFB5 Sal I Fragment gebildet wurde. Die Orientierung des Transposons innerhalb des Sal I Fragments wurde bei pFB505 nicht bestimmt. Die Plasmide sind linear, geöffnet an der Eco RI Schnittstelle, dargestellt. Tc^r bezeichnet die Tetracyclin-Resistenzregion, Ap^r die Ampicillin-Resistenzregion. Die dick gezogenen Linien kennzeichnen die pBR322 DNS. Erkennungsregionen der DNS Restriktionsenzyme: C = Cla I, E = Eco RI, P = Pst I, S = Sal I, X = Xho I.

3.1.3.3. Isolierung von Deletionsplasmiden von pPF3/V1

Bei den Komplementationsversuchen (3.2.) stellte sich heraus, daß es neben fhuA sowohl im Bakterienchromosom als auch auf den Plasmiden pCF1/V1 und pPF3/V1 noch weitere Komplementationsgruppen gibt, die auf Gene basieren, welche für Proteine codieren, die für die Albomycin Sensitivität und für die Aufnahme von Fe(III) mittels Ferrichrom notwendig sind. Deshalb wurden von pPF3/V1 mit Hilfe dreier verschiedener Methoden zunächst Deletionsplasmide isoliert. Mit Hilfe dieser Deletionsplasmide wurde dann im Minizellsystem untersucht, ob sie im Vergleich zu pPF3/V1 noch die Information für alle nachweisbaren Plasmid codierten Proteine besaßen oder ob bestimmte Proteine von diesen Plasmiden nicht mehr codiert wurden.

3.1.3.3.1. Plasmidverkleinerung durch Transformation mit linearisierter Plasmid DNS

Wenn ein E. coli K12 Stamm mit richtig modifizierter, durch ein Restriktionsenzym linearisierter Plasmid DNS transformiert wird, sinkt die Transformationsfrequenz im Vergleich zu zirkulärer Plasmid DNS sehr stark. Die wenigen Transformantenkolonien besitzen außerdem dann häufig Plasmide, die in dem Bereich, wo die einzige Restriktionsstelle für die verwendete Endonuklease ursprünglich lag, deletiert sind (23, 76).

Für die Erzeugung von Deletionen um die einzige Xho I Schnittstelle von pPF3/V1 wurde das Plasmid durch Behandlung mit Xho I linearisiert und dann in kompetente Zellen des Albomycin resistenten und T5 sensitiven Stammes H416 ArIV-1 transformiert. Bei diesem Stamm handelte es sich um einen H416 Abkömmling mit einer Mutation distal von fhuA, die zwar von den Tn5 Insertionsplasmiden pFB101 und pFB102, aber nicht mehr von pFB1 (Tn5 Insertion in fhuB) zur Albomycinsensitivität komplementiert wurde (fhuB Mutation, 3.2.2.).

Da sich die Xho I Schnittstellen von pPF3/V1 in der Nähe des Tn*5* Insertionsorts von pFB1 (Abb. 10, h) befindet, war zu erwarten, daß eine Deletion um die Xho I Schnittstelle auch den Ausfall der Komplementation zur Albomycin Sensitivität zur Folge hatte.

Auf der TY-Tetracyclinplatte wuchsen nach dem Ausplattieren des gesamten Transformationsansatzes 106 Klone. Von 48 dieser Klone, die getestet wurden, waren 43 T5 und Albomycin sensitiv und 5 T5 sensitiv und Albomycin resistent. Aus diesen resistenten Klonen konnten die Plasmide pXC11, pXC17, pXC21, pXC37 und pXC46 isoliert werden (Abb. 12, a), die wie die Restriktionsanalyse mit Pst I zeigte, verschieden große Deletionen um die Xho I Schnittstelle aufwiesen. Keines dieser Plasmide konnte mit Xho I linearisiert werden. Die Plasmide pXC11, pXC17 und pXC21 besaßen nur kleine Deletionen innerhalb des 0,93 Md Pst I Fragments von pPF3/V1. pXC46 wies dagegen innerhalb dieses Fragments eine Deletion von 0,5 Md auf und pXC37 entstand durch eine Deletion von 0,95 Md, die sich bis in das benachbarte Pst I Fragment, in dem sich auch die pBR322 DNS befand, erstreckte.

3.1.3.3.2. Verkleinerung mit Eco RI* Aktivität

Das Restriktionsenzym Eco RI erkennt bei hoher Ionenstärke das Hexanukleotidpaar $\overset{G}{C}\overset{AATTC}{TTAA}\overset{G}{}$ (58) und spaltet es im DNS Doppelstrang an der eingezeichneten Stelle bei pH 7,3. Erhöht man den pH der Inkubationslösung auf pH 8,5 und erniedrigt man die Ionenkonzentration, dann spaltet das gleiche Enzympräparat auch sekundär die Tetranukleotidpaare $\overset{}{}\overset{AATT}{TTAA}\overset{}{}$ (58, 77). Man bezeichnet diese Spaltaktivität mit Eco RI*.

pPF3/V1 wurde 60 bis 120 Min. mit Eco RI* gespalten und anschließend mit T4 DNS-Ligase behandelt (2.2.9.3.). Die Ligationsproben wurden einmal in den Stamm H416 fhuA13 und das andere Mal in H416 ArIV-1 (3.1.3.3.1.) transformiert. Die Tetracyclin resistenten Transformanten

testete man dann, ob sie den Stamm H416 fhuA13 zur T5 und Albomycin Sensitivität und ob sie H416 ArIV-1 zur Albomycin Sensitivität komplementieren konnten. Aus Transformanten, welche die fhuA13 Mutation beziehungsweise die ArIV-1 Mutation (fhuB Mutation) nicht vollständig komplementierten, wurde die Plasmid DNS isoliert. In der Regel handelte es sich um Deletionsplasmide, denen im Vergleich zu pPF3/V1 ein größerer DNS Bereich fehlte (Abb. 12, b). Da Eco RI* bevorzugt die Eco RI Erkennungssequenz spaltet, gingen die Deletionen alle von der Eco RI Schnittstelle von pPF3/V1 aus und erstreckten sich verschieden weit in das pBR322 Insert. Deletionen, die sich weit in die pBR322 DNS hinein erstreckten, wurden nicht in den Tetracyclin resistenten Klonen gefunden, da solche Plasmide sehr wahrscheinlich die Tetracyclin-Resistenzregion oder die Replikationsregion betroffen hätten, die für die Selektion und Stabilität der Plasmide in den Transformanten notwendig war.

Die Deletion, die zu den Plasmiden pPF3/V1 del2-15 beziehungsweise del5-1 (Abb. 12, b) führte, die aus T5 sensitiven und Albomycin resistenten Transformanten des Stamms H416 fhuA13 isoliert wurden, beginnt an der Eco RI Schnittstelle von pPF3/V1 und endet unmittelbar nach der Pst I Schnittstelle des 3,5 Md Pst I Fragment, in dem auch fhuA lokalisiert wurde (3.1.3.2.1., Abb. 8). Der Sal I Verdau sowie die Doppelrestriktionen von pPF3/V1 del2-15 mit Eco RI und Sal I oder Cla I und Sal I ergaben für das verbleibende Fragment zwischen Eco RI und Sal I ein Molekulargewicht von 0,4 Md. Die Deletion von pPF3/V1 del2-9 aus einem T5 und Albomycin resistenten H416 fhuA13 Klon erstreckt sich dagegen, wie sich aus den Größen der beiden Sal I Fragmente ergab, von der Eco RI Schnittstelle bis in das 1,65 Md Sal I Fragment von pPF3/V1 hinein. Sowohl die Deletionsform von pPF3/V1 del2-15 als auch die von pPF3/V1 del2-9

wurde bei mehreren verschiedenen Transformantenklonen gefunden.

3.1.3.3.3. Verkleinerung durch Behandlung von linearisierter DNS mit Sau 3a

pPF3/V1 wurde zunächst an der einzigen Xho I Schnittstelle durch Inkubation mit Xho I linearisiert und dann für 10, 15 oder 25 Min. mit der Restriktionsendonuklease Sau 3a weiter gespalten (2.2.9.4.). Sau 3a erkennt als spezifische DNS Spaltstelle nicht eine bestimmte Sequenz von 6 Basenpaaren wie Xho I, sondern nur 4 Basenpaare, das heißt, Sau 3a spaltet häufiger als Xho I. Die mit Sau 3a nachbehandelte DNS wurde dann wieder ligiert und in die Stämme H416 fhuA13 (3.1.1.) und H416 ArIV-1 transformiert (3.2.2.). Die Transformanten wurden auf TY-Tetracyclinplatten selektioniert. Aus T5 sensitiven und Albomycin resistenten H416 fhuA13 und aus T5 resistenten und Albomycin resistenten H416 fhuA13 Transformantenklonen beziehungsweise aus T5 sensitiven und Albomycin resistenten Transformantenklonen des Stamms H416 ArIV-1 wurde die Plasmid DNS isoliert. Es konnte angenommen werden, daß Plasmide aus solchen Klonen Sau 3a Fragmentdeletionen um die Xho I Schnittstelle herum besaßen, die zur Folge hatten, daß die fhuA13 Mutation oder die ArIV-1 Mutation nicht mehr komplementiert wurde.

Auf diese Weise wurden die Plasmide pPF3/V1 del4-1, pPF3/V1 del6-10 aus H416 fhuA13 Transformanten und pPF3/V1 del06-2, pPF3/V1 del06-3, pPF3/V1 del06-4, pPF3/V1 del06-6 und pPF3/V1 del06-11 aus H416 ArIV-1 Transformanten isoliert (Abb. 12, c). Alle Plasmide außer pPF3/V1 del06-6 und del06-11 waren durch Sau 3a Deletionen um die Xho I Schnittstelle von pPF3/V1 entstanden. pPF3/V1 del06-6 und del06-11, die aus nicht vollständig Albomycin resistenten H416 ArIV-1 Transformanten isoliert wurden, besaßen dagegen noch die Xho I Schnittstelle. Diese Plasmide waren also durch direkten Angriff

der zirkulären pPF3/V1 DNS durch Sau 3a entstanden.

Die Bestimmung der Deletionsgröße der einzelnen Plasmide durch Sal I und Pst I Restriktionen ergab, daß es sich außer bei pPF3/V1 del6-10 immer um große Deletionen handelte, die sich bis in das fhuA Gen hinein (3.1.3.2.1.) erstreckten (Abb. 12, c). Die Deletion von pPF3/V1 del6-10, die in H416 fhuA13 Transformanten die Komplementation zur Albomycin Sensitivität verhinderte, während das Plasmid aber noch zur T5 Sensitivität komplementierte, mußte einen DNS Abschnitt von pPF3/V1 betreffen, der für die Albomycin Sensitivität genauso notwendig war wie fhuA. Dieser DNS Abschnitt war aber in den Plasmiden pPF3/V1 del06-6 und del06-11 vorhanden. Diese Plasmide konnten nämlich die chromosomale Mutation, die sich gerade bei H416 ArIV-1 in dieser Region befand, wenigstens partiell zur Albomycin Sensitivität komplementieren.

3.1.3.4. Plasmidverkleinerungen durch Ligation von Sal I oder Pst I behandelter Plasmid DNS

Neben den soeben beschriebenen Möglichkeiten der Isolierung von Deletionsplasmiden von pPF3/V1 war es auch möglich, Plasmide wie schon zuvor beschrieben (3.1.3.1.) durch partiellen Verdau der isolierten Plasmid DNS mit einem Restriktionsenzym zu spalten und nach Ligation wieder in einen Bakterienstamm zu transformieren, der in fhuA oder im benachbarten Genbereich mutiert war. Transformanten mit veränderten Plasmiden konnten dann gegebenenfalls direkt auf Grund ihrer Eigenschaften gegenüber T5 und Albomycin selektioniert werden.

3.1.3.4.1. Verkleinerung von pPF3 mit Sal I

Von pPF3 konnte nach partiellem Verdau mit Sal I und Religation (2.2.7., 2.2.9.5.) aus T5 und Albomycin resistenten Transformantenklonen von H416 fhuA13 (3.1.1.) die Verkleinerungsformen pPF3/SV2, pPF3/SV3, pPF3/SV4 und pPF3/SV10 und aus T5 sensitiven und Albomycin resisten-

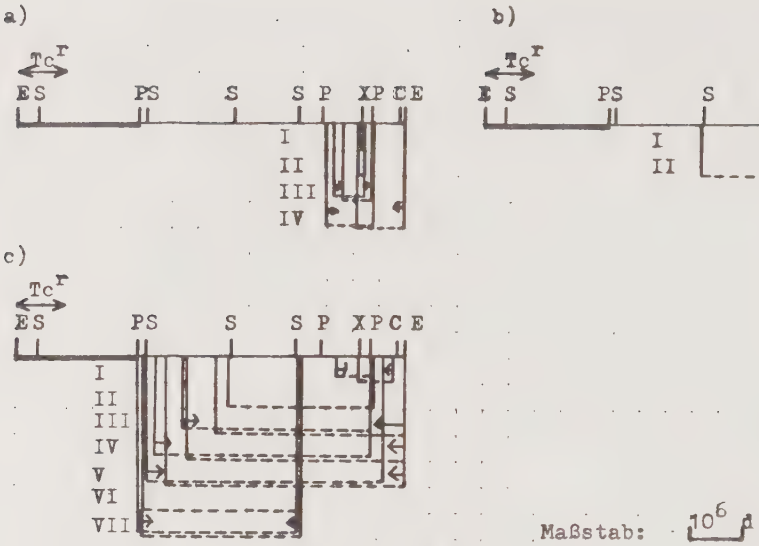


Abb. 12: Deletionsformen von pPF3/V1. pPF3/V1 wurde linear dargestellt, geöffnet an der einzigen Eco RI Schnittstelle. a) Deletionen nach Transformation mit Xho I linearisierter pPF3/V1 DNS. Deletion I bei pXC17 und pXC21 (0,05 Md); Deletion II bei pXC11 (0,12 Md); Deletion III bei pXC46 (0,5 Md); Deletion IV bei pXC37 (0,95 Md). b) Deletionen nach Eco RI* Verdau. Deletion I bei pPF3/V1 del2-15 (1,6 Md); Deletion II bei pPF3/V1 del2-9 (3,4 Md). c) Verkleinerungsformen nach Xho I - Sau 3a Doppelverdau. Deletion I bei pPF3/V1 del6-10 (0,65 Md); II bei pPF3/V1 del06-2 (2,8 Md); III bei pPF3/V1 del06-3 (3,6 Md); IV bei pPF3/V1 del06-4 (4,15 Md); V bei pPF3/V1 del4-1 (4,55 Md); VI bei pPF3/V1 del06-6 (3 Md) und VII bei pPF3/V1 del06-11 (3,05 Md). Die Bestimmung der Größe der Deletionen und deren Lokalisierung erfolgte durch Restriktionsanalyse mit Pst I und Sal I. Die gestrichelten Linien geben die deletierten DNS Fragmente der einzelnen Deletionsplasmide an. ⊢---⊣ bedeutet, daß sich die Deletion auf Grund der Restriktionsanalyse nur annähernd genau kartieren ließ. Sie kann sich aber nur in den mit Pfeilen gekennzeichneten Grenzen bewegen. Sonstige Bezeichnungen wie in Abb. 11.

ten Kolonien die Verkleinerungsformen pPF3/SV1 und die Plasmidvariante pPF3/SVT1 (Abb. 13, b) isoliert werden. Die physikalischen Karten dieser Plasmide konnten auf Grund der Daten des Wanderungsverhaltens der zirkulären Plasmid DNS im Agarosegel und der Restriktionsanalyse mit Sal I und teilweise auch mit Pst I gezeichnet werden. Keines der Deletionsplasmide komplementierte H416 fhuA13 zum Wachstum mit Ferrichrom als Eisenkomplexbildner. Nur H416 fhuA13 Transformanten mit dem Deletionsplasmid pPF3/SV2 zeigten Wachstum mit Rhodothorulasäure als Eisenkomplexator (Tab. 3).

Bei pPF3/SV2, pPF3/SV3, pPF3/SV4, pPF3/SV10 und pPF3/SV1 (Abb. 13, a) handelte es sich um pPF3 Abkömmlinge, die auf Grund des Verlustes eines oder mehrerer Sal I Fragmente die Fähigkeit zur vollständigen Komplementation der fhuA13 Mutation des Stamms H416 verloren hatten. Dagegen waren bei pPF3/SVT1 noch alle Sal I Fragmente vorhanden – nur ein Sal I Fragment hatte seine Orientierung innerhalb des Plasmids im Vergleich zu pPF3 geändert (Abb. 13, b).

Tab. 3: Test von H416 fhuA13 Transformanten mit pPF3 und mit dessen Plasmidvarianten, die durch partiellen Verdau mit Sal I und Religation entstanden waren, auf T5 und Albomycin Sensitivität, sowie auf Wachstum mit Ferrichrom und Rhodothorulasäure zur Eisenversorgung (2.2.5.).

Stamm H416 fhuA13 transformiert mit	Sensitivität gegenüber		Wachstum mit	
	T5	Albomycin	Ferrichrom	Rhodothorulasäure
0	-	-	-	-
pPF3	+	+	++	+
pPF3/SV1	+	-	-	-
pPF3/SVT1	+	-	-	-
pPF3/SV2	-	-	-	+
pPF3/SV3	-	-	-	-
pPF3/SV4	-	-	-	-
pPF3/SV10	-	-	-	-

Erläuterungen: wie bei der Tabelle 2.

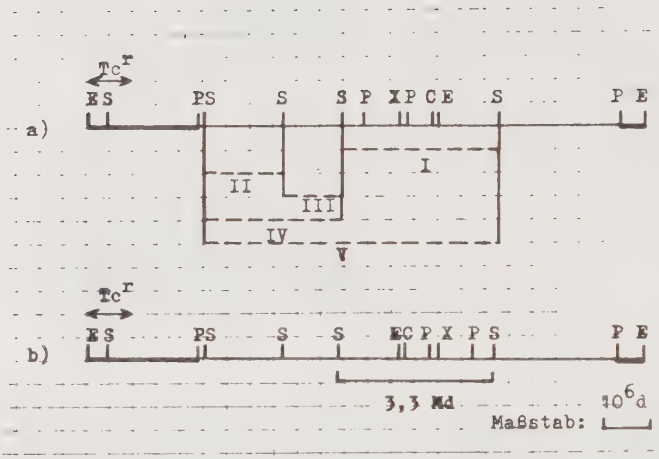


Abb. 13: Physikalische Karte von pPF3, die linear an der Eco RI Schnittstelle geöffnet gezeichnet wurde (a)). I bis V bezeichnen das Ausmaß der Deletionen bei den einzelnen Sal I Deletionsplasmiden. Deletion I bei pPF3/SV1 (Deletion von 3,3 Md); II bei pPF3/SV2 (Deletion von 1,65 Md); III bei pPF3/SV4 (Deletion von 1,25 Md); IV bei pPF3/SV3 (Deletion von 1,25 und 1,65 Md); V bei pPF3/SV10 (Deletion von 1,25, 1,65 und 3,3 Md).
b) Physikalische Karte von pPF3/SVT1, das durch die Änderung der Orientierung des 3,3 Md Sal I Fragments aus pPF3 entstanden war. Die gestrichelten Linien unter den physikalischen Karten geben das Ausmaß der einzelnen Deletionen an. Die Linie unter pPF3/SVT1 bezeichnet das vertauschte Sal I Fragment. Sonstige Bezeichnungen wie in Abb. 11.

3.1.3.4.2. Verkleinerung von pPF3/V1 und pPF3/V1 del2-15 mit Sal I

Die Sal I Deletionsplasmide von pPF3/V1 und pPF3/V1 del2--15 (Abb. 14, a, b) waren für die Untersuchung der Plasmid codierten Proteinsynthese notwendig und zwar vor allem für die Untersuchung der Proteine, die in der Nachbarschaft von fhuA codiert werden. pPF3/V1 und pPF3/V1 del2-15 wur-

den durch 25 Min. lange Inkubation mit Sal I partiell gespalten (2.2.7., 2.2.9.5.) und dann mit T4 DNS-Ligase behandelt. Die ligierten DNS Proben transformierte man jeweils in den Albomycin resistenten und T5 sensitiven Stamm H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Ar12 und in den T5 und Albomycin resistenten Stamm H416 fhuA13. Komplementationsversuche zeigten (3.2.3.), daß die Mutation Ar12 einen DNS Abschnitt betrafen, der unmittelbar fhuA benachbart war (fhuC) und der durch das 1,25 Md Sal I Fragment von pPF3 oder pPF3/V1 komplementiert wurde.

Aus Albomycin und Tetracyclin resistenten und T5 sensitiven Transformantenklonen des Stamms H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Ar12 konnten so pPF3/V1/SV3 isoliert werden, bei dem das 1,25 und 1,65 Md Sal I Fragment von pPF3/V1 fehlte, sowie pPF3/V1 del2-15/SV3, bei dem auch die 1,25 und 1,65 Md Sal I Fragmente fehlten. Bei pPF3/V1 del2-15/SV5 war dagegen nur das 1,25 Md Sal I Fragment durch Deletion verloren gegangen (Abb. 14, a, b). Die Deletionsplasmide pPF3/V1/SV2 (Deletion von 1,65 Md), pPF3/V1/SV5 (Deletion von 1,25 Md) und pPF3/V1 del2-15/SV2 (Deletion von 1,65 Md) wurden dagegen aus T5 und Albomycin resistenten H416 fhuA13 Kolonien isoliert (Abb. 14 a, b).

Der Aufbau der Sal I Deletionsplasmide, der sich aus den restlichen Sal I Fragmenten und aus der Größe der Plasmide ergab, bestätigte sich bei der Untersuchung der Eigenschaften der Transformanten von H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Ar6 und Ar12 (Tab. 4). Die Mutation Ar6 (fhuB, 3.2.3.), die wie die Mutation Ar12 (fhuC, 3.2.3.) Albomycin Resistenz und T5 Sensitivität zur Folge hat, liegt etwas weiter entfernt von fhuA als die Mutation bei Ar12. Die Sal I Deletionsformen von pPF3/V1 konnten die Ar6 Mutation wenigstens partiell komplementieren (Tab. 4) – dagegen komplementierten die Sal I Deletionsplasmide von pPF3/V1 del2-15, wegen der Eco RI* Deletion (Abb. 12, b, Deletion I) diese Mutation nicht. Die Komplementation

der Ar12 Mutation erfolgte dann, wenn die Deletionsplasmide das 1,25 Md Sal I Fragment besaßen.

3.1.3.4.3. Verkleinerung von pPF3 und pPF3/V1 mit Pst I

Die Pst I Deletionsformen von pPF3 (Abb. 14, d) und pPF3/V1 (Abb. 14, c) konnten nach 3 bis 10 Min. langem partiellem Verdau dieser Plasmide mit Pst I und anschliessender Ligation (2.2.7., 2.2.9.5.) aus Tetracyclin resistenten H416 fhuA13 (3.1.1.) und H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Ar6 (fhuB, 3.2.3.) Transformantenklonen isoliert werden. Der Aufbau dieser Plasmide wurde durch Restriktionsanalyse mit Sal I und Pst I aufgeklärt. Daneben wurden wie zuvor die Komplementationseigenschaften dieser Plasmide in H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Ar6 und Ar12 getestet (Tab. 4).

In T5 sensitiven, Albomycin und Tetracyclin resistenten H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Ar6 Transformantenkolonien wurden die Plasmide pPF3/V1/PV1 (Deletion von 0,93 Md), pPF3/V1/PV3 (Deletion von 3,5 und 0,93 Md) gefunden, während pPF3/V1/PV2 (Deletion von 3,5 Md) aus einem T5 und Albomycin resistenten H416 fhuA13 Klon stammte (Abb. 14, c). Nur pPF3/V1/PV1 komplementierte die Ar12 Mutation (Tab. 4). Dagegen komplementierte pPF3/V1/PV2 die Ar6 Mutation vollständig im Gegensatz zu pPF3/V1/SV3 (3.1.3.4.2.) zur Albomycin Sensitivität.

Neben diesen Deletionsformen von pPF3/V1 wurden aus T5 und Albomycin sensitiven H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Ar6 Kolonien auch Plasmide isoliert, die genau doppelt so groß waren wie pPF3/V1. pPF3/V1/D1 (Abb. 14, c') bestand aus zwei pPF3/V1 Molekülen, die jeweils an der gleichen Pst I Schnittstelle geöffnet und dann so verknüpft wurden, daß die Polarität der Gene auf dem neuen Plasmid mit derjenigen von pPF3/V1 identisch war. Dagegen war pPF3/V1/D2 so aufgebaut, daß die beiden miteinander verknüpften, nicht an der gleichen Pst I Schnittstelle linearisierten pPF3/V1 Moleküle gegenläufige Polarität zeigten.

Der pPF3 Pst I Abkömmling pPF3/PV2 (Abb. 14, d; Deletion von 3,5 Md) wurde aus einem T5 und Albomycin sensitiven H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Ar6 Transformantenklon isoliert. pPF3/PV3 (Deletion von 3,5 und 0,93 Md) und pPF3/PV5 (Deletion von 4,5 und 0,93 Md) und pPF3/D1 (Deletion von 4,5 Md; Duplikation des 3,5 Md Pst I Fragments, Abb. 14, d') wurden in T5 sensitiven und Albomycin resistenten Transformantenklonen desselben Stamms gefunden. Von diesen Plasmiden konnte nur pPF3/PV5 und pPF3/D1 die Ar12 Mutation komplementieren (Tab. 4). Die Plasmide pPF3/PV4 und pPF3/PV4-1 (Deletion von 4,5 Md) stammten aus T5 sensitiven und Albomycin resistenten H416 fhuA13 Transformanten. Beide Plasmide wurden durch Pst I in Fragmente identischer Größe gespalten. Dagegen zeigte der Verdau mit Sal I, daß die beiden Plasmide einen unterschiedlichen Aufbau hatten. Während bei pPF3/PV4-1 die 0,93 und 3,5 Md Pst I Fragmente genauso orientiert waren wie bei pPF3, war bei pPF3/PV4 die Orientierung dieser Fragmente genau umgekehrt.

Sowohl pPF3/PV4 als auch pPF3/PV4-1 konnten bei H506 r^-m^-(1) fepA1/2 nur die Ar12 (fhuC) Mutation, nicht aber die weiter distal von fhuA lokalisierte Ar6 (fhuB) Mutation komplementieren (Tab. 4). Dagegen wurde die Mutation Ar6 des genannten Stamms von pPF3/V1/PV2 und dem analogen Plasmid pPF3/PV2 (Deletion des 3,5 Md Pst I Fragments) so komplementiert, daß die Transformanten vollständig Albomycin sensitiv waren. Zur Komplementation der Ar6 Mutation (fhuB) war also neben dem 0,93 Md Pst I Fragment noch ein kleiner Teil des 4,5 Md Pst I Fragments notwendig, der gerade noch in dem pPF3 Deletionsplasmid pPF3/V1 enthalten war.

Tab. 4: Eigenschaften von Transformanten der Stämme H506 r⁻ m⁻ (1) fepA(1/2) Ar6 (fhuB) und Ar12 (fhuC, 3.2.3.) mit Sal I und Pst I Deletionsplasmiden von pPF3, pPF3/V1 und pPF3/V1 del2-15 gegenüber T5 Phagen und dem Antibiotikum Albomycin (2.2.5.).

Plasmid	Deletion in Md (oder Veränderung)	H506 r⁻m⁻(1) fepA1/2 Mutante Ar6 T5	Ar6 Albomycin	Ar12 T5	Ar12 Albomycin
0	0	+	-	+	-
pPF3/V1/SV2	1,65	+	+	+	+
pPF3/V1/SV3	1,65, 1,25	+	∓	+	-
pPF3/V1/SV5	1,25	+	∓	+	-
del2-15/SV2	1,65	+	-	+	+
del2-15/SV3	1,65, 1,25	+	-	+	-
del2-15/SV5	1,25	+	-	+	-
pPF3/V1/PV1	0,93	+	-	+	+
pPF3/V1/PV3	0,93, 3,5	+	-	+	-
pPF3/V1/PV2	3,5	+	+	+	-
pPF3/V1/D1	Duplikation	+	+	+	+
pPF3/V1/D2	Duplikation	+	+	+	+
pPF3/PV3	0,93, 3,5	+	-	+	-
pPF3/PV2	3,5	+	+	+	-
pPF3/PV5	4,5 0,93	+	-	+	+
pPF3/PV4[1)]	4,5	+	-	+	+
pPF3/PV4-1	4,5	+	-	+	+
pPF3/D1[2)]	4,5	+	-	+	+

Erläuterung: + bedeutet: Albomycin oder T5 Sensitivität; - bedeutet: Albomycin oder T5 Resistenz; ∓ bedeutet: nur partielle Albomycin Sensitivität. 1) 0,93 und 3,5 Md Pst I Fragmente umgekehrt wie in pPF3 orientiert. 2) Duplikation des 3,5 Md Pst I Fragments von pPF3.

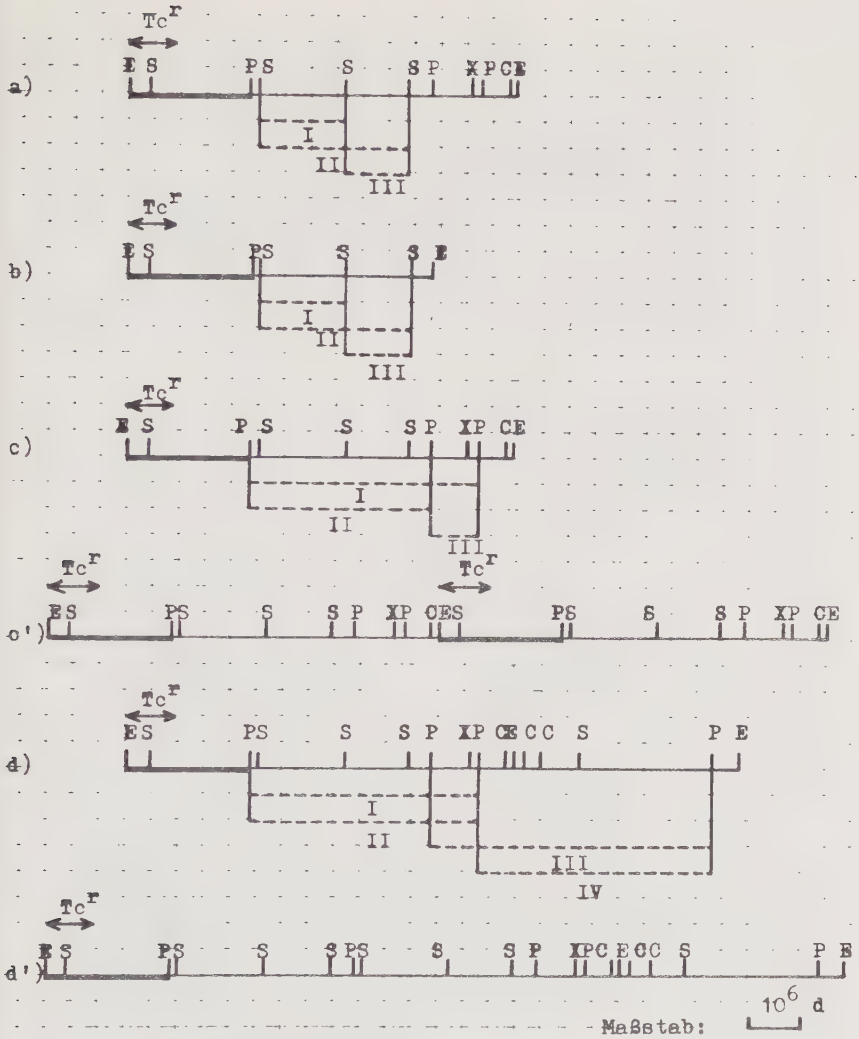


Abb. 14: Lineare Darstellung der Plasmide pPF3/V1 (a), pPF3/V1 del2-15 (b), pPF3/V1 (c) und pPF3 (d), geöffnet an der Eco RI Schnittstelle der pBR322 DNS (dick gezogene Linie) und der Sal I-Fragmentdeletionen beziehungsweise Pst I-Fragmentdeletionen (c) und d)). a) Sal I Deletionen (gestrichelte Linien) von pPF3/V1. Deletion I bei pPF3/V1/SV2 (Deletion von 1,65 Md); Deletion II bei pPF3/V1/SV3 (1,25 und 1,65 Md); III bei pPF3/V1/SV5 (1,25 Md). b) Sal I Deletionen von pPF3/V1 del2-15. Deletion I bei pPF3/V1 del2-15/SV2 (Deletion von 1,65 Md); II bei pPF3/V1 del2-15/SV3 (1,25 und 1,65 Md);

III bei pPF3/V1 del2-15/SV5 (1,25 Md). c) Pst I Deletionen von pPF3/V1. Deletion I bei pPF3/V1/PV3 (Deletion von 3,5 und 0,93 Md); II bei pPF3/V1/PV2 (3,5 Md); III bei pPF3/V1/PV1 (0,93 Md). c') Das Plamsid pPF3/V1/D1, das ein dimeres Molekül von pPF3/V1 darstellt. d) Pst I Deletionen von pPF3. Deletion I bei pPF3/PV3 (Deletion von 3,5 und 0,93 Md); II bei pPF3/PV2 (3,5 Md); III bei pPF3/PV5 (4,5 und o,93 Md); IV bei pPF3/PV4-1 und pPF3/PV4 (4,5 Md); bei pPF3/PV4 sind die restlichen 3,5 und 0,93 Md Pst I Insertionsfragmente umgekehrt wie hier gezeichnet in pBR322 integriert. d') pPF3/D1, das zweimal das 3,5 Md Pst I Fragment von pPF3 direkt hintereinander geschaltet enthält. Plasmidbezeichnungen siehe Abb. 11.

3.2. Komplementationsversuche

Unmittelbar neben dem Gen *fhuA* befinden sich im Bakterienchromosom noch DNS Bereiche, die für die antibiotische Wirkung von Albomycin bei *E. coli* K12 und für das Einschleusen von Fe(III) mit den Komplexbildnern Ferrichrom, Rhodothorulasäure (41), Aerobactin (12, 13) und einigen anderen Siderophoren notwendig sind. Es wurde festgestellt (41), daß neben *fhuA* mindestens noch eine unabhängige Transkriptionseinheit vorlag, die mit *fhuB* bezeichnet wurde und die für die Verwertung von Ferrichrom gebundenem Fe(III) durch die Zelle notwendig war. Dagegen sollte ein drittes Gen, *fhuC*, das zwischen *fhuA* und *fhuB* vermutet wurde, nur zur Aufnahme von Rhodothorulasäure dienen.

Es wurde nun untersucht, ob chromosomale Mutationen um *fhuA* und von *fhuA* selbst durch die konstruierten Plasmide komplementiert werden konnten. Durch Komplementationsversuche mit Tn*5* Insertionsplasmiden und Deletionsplasmiden konnte bei den meisten Mutanten der Ort der betreffenden Mutation bestimmt werden. Es konnte so auch bestimmt werden, daß zum Beispiel zwei verschiedene Tn*5* Insertionen in der *fhuA* benachbarten Region der Plasmide die gleiche Komplementationsgruppe betrafen.

Bei diesen Untersuchungen wurden Mutanten der Stämme H416 und H506 r^-m^-(1) *fepA*1/2 (2.2.10., 2.2.11., 2.2.12.)

verwendet, die auf Grund ihrer Albomycin Resistenz selektioniert wurden. Da H416 wegen der aro^- Mutation nicht zur Synthese von Enterochelin (84) befähigt ist und da H506 r^-m^-(1) fepA1/2 auf Grund der fepA1/2 Mutation Enterochelin gebundenes Fe(III) nur schlecht aufnehmen kann (60), konnten diese Stämme und die Mutanten und Transformanten auf Wachstum mit Hilfe von Ferrichrom und Rhodothorulasäure zur Eisenversorgung untersucht werden (2.2.5.).

3.2.1. Isolierung der Albomycin resistenten Mutanten von H416

In einem ersten Versuch wurden aus den Albomycinhemmhöfen der Selektionsplatten (2.2.12.) nur solche Mutanten näher untersucht, die sich im Querstrichtest als T5 sensitiv und Albomycin resistent erwiesen. Die wenigen T5 und Albomycin resistenten Mutanten wurden nicht berücksichtigt. Die näher untersuchten sieben Albomycin resistenten Klone des ersten Versuchs bezeichnete man nach der Selektionsplatte, auf der sie gefunden wurden und nach der Kolonie-Nummer mit arabischen Zahlen, wie zum Beispiel H416 Ar2/2. Im ersten Versuch wurden durch Komplementationsanalyse sowohl Albomycin resistente Mutanten getestet, die T5 sensitiv waren und noch mit Ferrichrom wuchsen als auch solche, die T5 sensitiv waren und nicht mehr mit Ferrichrom wachsen konnten (Tab. 5). In einem zweiten Versuch wurden jedoch nur solche Albomycin resistenten Mutanten getestet, die entweder T5 und Albomycin resistent waren und auch nicht mit Ferrichrom und Rhodothorulasäure wuchsen oder solche, die T5 sensitiv waren und keine Wachstumsförderung mit Ferrichrom und Rhodothorulasäure zeigten. Diese Albomycin resistenten Mutanten des zweiten Versuchs wurden wie die des vorherigen Versuchs bezeichnet, nur daß die Nummer der Selektionsplatte, von der eine bestimmte Mutante abstammte, eine lateinische Zahl erhielt (Tab. 5).

3.2.2. Lokalisierung der Mutationen, die Albomycin Resistenz bewirkten

Der Albomycin und T5 sensitive Stamm H416 wurde wie die Albomycin resistenten Mutanten mit pPF3 Plasmidabkömmlingen und mit Tn*5* Insertionsplasmiden (Abb. 15) transformiert. Die Untersuchung dieser Transformanten (2.2.5.) ergab, daß die Plasmide keinen großen Einfluß auf die T5 oder Albomycin Sensitivität und auf das Wachstum mit Ferrichrom ausübten (Tab. 5). Es zeigte sich jedoch, daß alle Transformanten, außer diejenige mit pPF3/SV2, schlechter mit Hilfe von Rhodothorulasäure wuchsen als der Ursprungsstamm. In den Komplementationsversuchen der Albomycin resistenten Transformanten Ar4/2, Ar4'/2, ArIX/1 und ArIV/1 zeigten meistens auch nur Transformanten mit pPF3/V1 oder mit pPF3/SV2 ein so gutes Wachstum mit Ferrichrom und Rhodothorulasäure wie der Wildtypstamm. Bei vielen anderen Transformanten war dagegen nur eine schwächere Wachstumsantwort mit Ferrichrom zu verzeichnen. Da die Wachstumsförderung mit Rhodothorulasäure immer viel schwächer als mit Ferrichrom ausfiel, war dann bei diesen Transformanten um die Rhodothorulasäure-Filterrondelle oft kein Wachstumshof mehr eindeutig zu erkennen.

pPF3/SV2 komlementierte genauso wie pPF3/V1 (Abb. 15) alle anderen Mutationen, die in der Nähe von *fhuA* lokalisiert sind und die Albomycin Resistenz bewirken, zur Albomycin Sensitivität. Es war deshalb anzunehmen, daß diese Plasmide alle chromosomalen Bereiche neben *fhuA* enthielten, die für die Aufnahme von Albomycin beziehungsweise von Ferrichrom und Rhodothorulasäure gebundenem Fe(III) notwendig waren. Gleichzeitig mußten dann, wenn es sich dabei um mehrere Genorte handelte, die Genprodukte für eine gute Komplementation in einem ausgewogenem Verhältnis in der Zelle vorliegen, so wie dies nur bei den Plasmiden mit der gesamten *fhu* Region oder mit pPF3/SV2 und den analogen Plasmiden der Fall war.

Von den im ersten Versuch isolierten und näher charakterisierten sieben Mutanten von H416 erwiesen sich bei der Untersuchung nur noch fünf Mutanten als wirklich Albomycin resistent, Die Mutanten H416 Ar3/2 und H416 Ar4'/1 waren dagegen nur partiell Albomycin resistent und konnten noch mit Ferrichrom und Rhodothorulasäure wachsen. Die Transformanten dieser Stämme erlaubten auf Grund der nur kleinen Unterschiede bezüglich der Albomycin Sensitivität keine klare Zuordnung dieser Mutationen zu einer Komplementationsgruppe der fhuA Region.

Die Albomycin resistente und T5 sensitive Mutante H416 Ar2/2, die Ferrichrom und Rhodothorulasäure wie der Stamm H416 verwertete, konnte nur mit pPF3 oder pPF3/V1 zur Albomycin Sensitivität oder partiellen Albomycin Sensitivität komplementiert werden (Tab. 5). Klaus Günthner entdeckte, daß die Mutante und einige ihrer Transformanten im Wachstumstest einen Wachstumshof um die Albomycin Filterrondelle zeigten; außerdem fand er bei der Mutante nur eine geringe Albomycin Spaltaktivität (28). Da nur ein Plasmid mit dem gesamten fhu Genbereich eine Komplementation zur Albomycin Sensitivität ermöglichte, aber andererseits die Mutante mit Albomycin wachsen konnte, verursachte die Mutation, daß Albomycin die Zelle zwar noch mit Fe(III) versorgen aber nicht mehr seine antibiotische Aktivität entfalten konnte. Da selbst pPF3/V1 und pPF3 nicht zur vollständigen Albomycin Sensitivität komplementierten, war nicht sicher nachgewiesen, daß die Mutation wirklich im fhu Genbereich des Bakterienchromosoms lokalisiert war. Es wurde später gezeigt (11a), daß die Mutation von Ar2/2 nicht die fhu Region betraf, sondern das Gen pepN, das für eine Peptidase codiert, die bei der Abspaltung der antibiotisch wirksamen Gruppierung von Albomycin wesentlich beteiligt ist.

Die Mutanten H416 Ar4/1 und Ar4'/4 (Tab. 5), die noch Wachstum mit Ferrichrom aber nicht mehr mit Rhodothorulasäure zeigten, konnten nur mit Plasmiden mit intaktem

fhuA (pPF3/SV1, pFB5, pFB103, pFB101) zur fast vollständigen oder partiellen Albomycin Sensitivität komplementiert werden. Es war anzunehmen, daß in beiden Fällen eine Mutation in fhuA vorlag, die keine Auswirkung auf die T5 Sensitivität zeigte aber nur noch gemäßigtes Wachstum mit Ferrichrom erlaubte. Der Ausfall des Wachstums mit Rhodothorulasäure konnte aber, da FhuA selbst nicht als Rezeptor für Rhodothorulasäure dient, nur so erklärt werden, daß durch die Mutation in fhuA ein polarer Effekt auf die benachbarten, für die Aufnahme der Eisenkomplexbildner notwendigen Gene, ausgeübt wurde (42a). Eine verminderte Expression dieser Gene verursachte dann das schlechtere Wachstum mit Ferrichrom und den Ausfall des Wachstums mit Rhodothorulasäure.

Die T5 sensitiven, Albomycin resistenten Mutanten H416 Ar4/2, ArIV/1, ArVI/2 und ArVII/2 zeigten alle das gleiche Komplementationsmuster (Tab. 5). Eine Komplementation zur Albomycin Sensitivität und zum Wachstum mit Ferrichrom und Rhodothorulasäure erfolgte nur mit Plasmiden, bei denen die distal von fhuA lokalisierte Region intakt war. Die Tn5 Insertion in pFB1, nicht aber die in pFB101, pFB103 und pFB5 (Abb. 15) inaktivierte diesen Bereich. Die Deletionsplasmide der Tn5 Insertionsplasmide pFB103/110, pFB5/101 und pFB3/106, bei denen nur ein Tn5 Xho I Fragment fehlte (Abb. 10, Deletionen I), konnten die H416 ArIV/1 Mutante komplementieren — dagegen zeigten die anderen Xho I Deletionsplasmide, bei denen auch das Xho I Fragment fehlte, das von der Xho I Schnittstelle des Plasmids pPF3/V1 oder pCF1/V1 und einer Xho I Schnittstelle von Tn5 eingerahmt wird (Abb. 10, Deletion III), keine Komplementation.Die Orte der chromosomalen Mutationen dieser Mutanten lagen nach diesen Ergebnissen nicht unmittelbar neben fhuA, sondern etwas weiter von fhuA entfernt. Man bezeichnete diese Mutanten in Anlehnung an die zuvor eingeführte Benennung (41) als fhuB Mutanten. Eine Mutation in fhuB betraf sowohl

das Wachstum mit Hilfe von Ferrichrom als auch dasjenige mit Rhodothorulasäure-gebundenem Fe(III) als einzige Eisenquelle.

Im Gegensatz zu den fhuB Mutanten konnte die Mutante H416 Ar4'/2 durch die Tn5 Insertionsplasmide pFB101 und pFB102 sowie mit pFB1 oder dem Deletionsplasmid pPF3/V1 del6-10 nicht mehr zur Albomycin Sensitivität und zum Wachstum mit den Eisenkomplexbildnern komplementiert werden (Tab. 5). Dagegen erfolgte eine gute Komplementation mit pFB5 und pFB103, bei denen die Tn5 Insertionen direkt dem fhuA Gen benachbart waren und mit pPF3/SV2. Während pPF3/SV3 die fhuB Mutation noch partiell komplementierte, erfolgte hier mit diesem Plasmid keine Komplementation. Die Mutation bei H416 Ar4'/2 betraf im Bakterienchromosom also nicht nur fhuB, sondern zusätzlich noch einen fhuB benachbarten DNS Abschnitt, der sich in Richtung fhuA bis zur Sal I Schnittstelle, die der Pst I Schnittstelle neben der Tn5 Insertion von pFB1 benachbart ist (Abb. 15), erstreckte. In diesem DNS Bereich lagen aber gerade die Tn5 Insertionsorte von pFB101 und pFB102. Durch diese Tn5 Insertionsplasmide war eine Komplementation von fhuB Mutanten möglich – nicht aber die Komplementation von H416 Ar4'/2. Neben fhuB war also bei dieser Mutation noch eine zweite Komplementationsgruppe betroffen, die zwar von den Tn5 Insertionsplasmiden pFB5 und pFB103 aber nicht mehr von pFB101 und pFB102 komplementiert wurde. Man bezeichnete die neben fhuB vorliegende Komplementationsgruppe mit fhuD.

Die T5 und Albomycin resistenten Mutanten H416 ArIII/2 und ArIX/1 konnten mit pPF3/SV2 nur zum Wachstum mit Rhodothorulasäure komplementiert werden (Tab. 5). Plasmide mit intaktem fhuA komplementierten dagegen sowohl zur T5 und Albomycin Sensitivität als auch zu mäßig gutem Wachstum mit Ferrichrom. Dies zeigte, daß es sich hier um fhuA Mutanten handeln mußte. Diese fhuA Muta-

tionen hatten aber wieder einen Effekt auf die benachbarten Gene, die für den hier untersuchten Fe(III)-Transport notwendig waren, denn es fiel bei den fhuA Mutanten, wie erwartet, nicht nur das Wachstum mit Ferrichrom, sondern auch mit Rhodothorulasäure aus. Die einzigartig gute Komplementation von pPF3/SV2 zum Wachstum mit Rhodothorulasäure zeigte, daß für eine gute Verwertung der Eisenkomplexverbindungen ein bestimmtes ursprüngliches Verhältnis der fhuA benachbarten Gene notwendig ist.

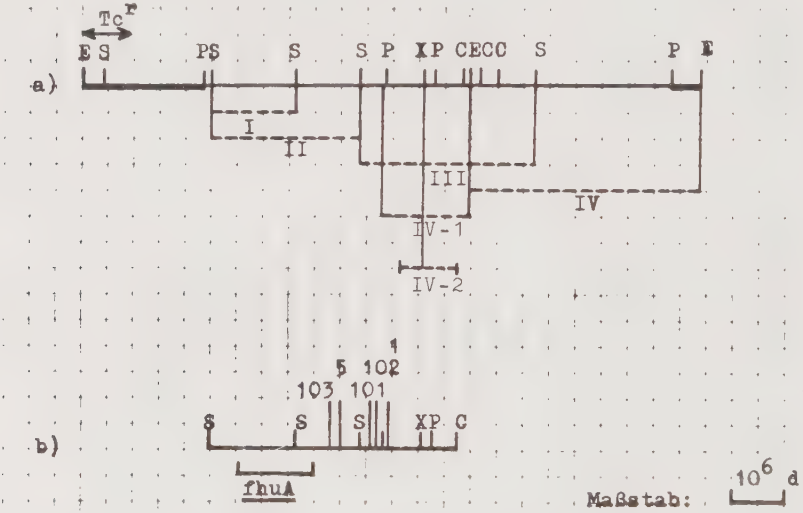


Abb. 15: Deletionsplasmide von pPF3 (a) und Orte der Tn5 Insertionen der Tn5 Insertionsplasmide (b), die bei den Komplementationsversuchen am häufigsten verwendet wurden. a) Lineare Darstellung von pPF3, geöffnet an der Eco RI Schnittstelle der pBR322 DNS (dick gezogene Linie). Die gestrichelten Linien kennzeichnen die fehlenden DNS Abschnitte der Deletionsplasmide: Deletion I bei pPF3/SV2; II bei pPF3/SV3; III bei pPF3/SV1; IV bei pPF3/V1 ; IV-1 Deletion bei pPF3/V1 Deletionsplasmid pPF3/V1 del2-15; IV-2 Deletion bei pPF3/V1 del6-10. b) Gemeinsamer chromosomaler DNS Bereich der fhu Region bei den Plasmiden pPF3/V1 und pCF1/V1. Die Orte der Tn5 Insertionen der Plasmide pFB103 (= 103), pFB5 (= 5), pFB101 (= 101), pFB102 (= 102) und pFB1 (= 1) in der Nachbarschaft von fhuA wurden eingezeichnet (siehe Abb. 8). Abkürzungen in der Zeichnung wie in Abb. 11.

Tab. 5: Test verschiedener Eigenschaften von H416, von Albomycin resistenten H416 Mutanten und deren Transformanten des ersten und zweiten Versuchsansatzes (3.2.1.). Die Bestimmung der T5 und Albomycin Sensitivität erfolgte mit Hilfe des Querstrichtests, während der Wachstumsförderungstest mit Ferrichrom und Rhodothorulasäure mit dem Plattendiffusionstest durchgeführt wurde (2.2.5.). Nur H416 Ar2/2 und H416 Ar4'/2 wurden auf Wachstum mit Hilfe von Albomycin getestet.

Albomycin resistente Mutante von H416	Transformante (Plasmid)	Sensitivität gegenüber T5	Sensitivität gegenüber Albomycin	Wachstum mit Ferrichrom	Wachstum mit Rhodothorulasäure [1]	Wachstum mit Albomycin
H416-WT	-	+	+	++	+	
	pPF3/SV2	+	+	++	+	
	pPF3/SV3	+	+	++	+o	
	pPF3/SV1	+	+	++	+o	
	pFB5	+	+	++	+o	
	pFB103	+	+	++	+o	
	pFB101	+	+	++	+o	
Ar2/2	-	+	-	++	+	+
	pPF3	+	+	++	+	- [2]
	pPF3/V1	+	+o	++	+	- [2]
	pPF3/SV2	+	-	++	+	+
	pPF3/SV3	+	-	++	+	+
	pPF3/SV1	+	-	++	+	+
	pFB5	+	-	++	+	+ [3]
	pFB103	+	-	++	+	+
	pFB101	+	-	++	+	+ [3]
Ar4/1 und Ar4'/4	-	+	-	+	-	
	pPF3/SV2	+	-	+o	-	
	pPF3/SV3	+	-	+o	-	
	pPF3/SV1	+	+oo	+o	-	
	pFB5	+	+o	+	+o	
	pFB103	+	+o	+	-	
	pFB101	+	+oo	+	-	
Ar4/2	-	+	-	-	-	
	pPF3/SV2	+	+	++	+	
	pPF3/SV3	+	-	+o	-	
	pPF3/SV1	+	-	-	-	
	pFB5	+	+	++	+	
	pFB103	+	+o	+o	-	
	pFB101	+	+	+	+o	

Fortsetzung Tab. 5:

Albomycin resistente Mutante von H416	Transformante (Plasmid)	Sensitivität gegenüber T5	Albomycin	Wachstum mit Ferrichrom	Rhodothorulasäure	Albomycin 1)
Ar4'/2	-	+	-	-	-	-
	pPF3/SV2	+	+	++	+	-
	pPF3/SV3	+	-	-	-	-
	pPF3/SV1	+	-	-	-	-
	pFB5	+	+	++	+	-
	pFB103	+	+oo	+	-	-
	pFB101	+	-	-	-	-
	pFB102	+	-	-	-	-
	pFB1	+	-	-	-	-
	pPF3/V1 del6-10	+	-	-	-	-
ArIII/2	-	-	-	-	-	
und	pPF3/V1	+	+	++	+	
ArIX/1	pPF3/SV2	-	-	-	+	
	pPF3/SV3	-	-	-	-	
	pPF3/SV1	+	+o	+o	-	
	pFB5	+	+oo	+	-	
	pFB103	+	+	+	-	
	pFB101	+	+	+	-	
	pFB1	+	+o	+	-	
ArVI/2;	-	+	-	-	-	
ArIV/1	pPF3/SV2	+	+	++	+	
und	pPF3/SV3	+	+oo	+o	-	
ArVII/2	pPF3/SV1	+	-	-	-	
	pFB5	+	+	+	+	
	pFB103	+	+o	+	+oo	
	pFB101	+	+	+	+o	
	pFB1	+	-	-	-	
Ergänzung	pFB103/110	+	+	+	-	
ArIV/1	pFB5/101	+	+	+	+o	
	pFB5/5	+	-	-	-	
	pFB5/109	+	-	-	-	
	pFB3/106	+	+	+	+o	
	pFB3/1	+	-	-	-	

Erläuterungen: Sensitivitätstest: + bedeutet vollständige Sensitivität und - bedeutet vollständige Resistenz im Querstrichtest. +o, +oo bedeuten, daß Albomycin um den Querstreifen herum (2.2.5.) das Wachstum nicht vollständig beziehungsweise nur partiell hemmte.
Wachstumstest: ++, +, +o, +oo — von ++ nach +oo: gute Wachstumszone bis nur schlecht erkennbare Wachstumszone um die betreffende Filterrondelle herum. ++ beziehungs-

weise +o geben hier an, ob es sich um eine eng begrenzte, auf Grund ihrer Dichte gut erkennbare Wachstumszone (++), oder aber um eine größere nicht scharf begrenzte schwächere Wachstumszone handelte (+o oder +oo). Die Wachstumsförderung durch Rhodothorulasäure war allgemein schwächer als die von Ferrichrom. Die Albomycinwachstumszonen konnten nach ihrer Intensität zwischen den von Ferrichrom und Rhodothorulasäure angesiedelt werden.
1) Wenn keine Wachstumsförderung mit Rhodothorulasäure erfolgte, war um die Filterrondelle oft eine Hemmzone erkennbar. 2) Normaler Hemmhof mit dünnem Wachstumsring umgeben. 3) Hemmbereiche und Wachstumszonen wechselten sich um die Filterrondelle ab.

3.2.3. Isolierung der Mutante H506 r^-m^-(1) fepA1/2

Der Minizellen produzierende Stamm H506 wurde zum Nachweis der Plasmid codierten Proteine verwendet (3.3.1.). Da dieser Stamm mit zahlreichen Plasmiden transformiert werden sollte, die teilweise aus dem r^-m^- Stamm H416 fhuA13 isoliert wurden und deren DNS deshalb nicht K12 spezifisch modifiziert war, wurden von diesem Stamm der Restriktions-und Modifikations-defekte Abkömmling H506 r^-m^-(1) isoliert (2.2.10.). Diese Mutante wurde als λCI(ts)::Tn10 lysogener Klon unter H506 Bakterienklonen auf einer TY-Tetracyclin Agarplatte gefunden, auf der H506 Zellen nach Infektion mit nicht K12 spezifisch modifizierten λCI(ts)::Tn10 Bakteriophagen ausplattiert wurden (56).

Damit Albomycin resistente Klone von H506 r^-m^-(1) im Komplementationsversuch auch auf Wachstum mit den Eisenkomplexbildnern Ferrichrom, Rhodotorulasäure und Albomycin getestet werden konnten, wurde von H506 r^-m^-(1) die Mutante fepA1/2 als Colicin B resistenter Klon isoliert (2.2.11.). Diese Mutante zeigte im Gegensatz zu H506 r^-m^-(1) auf den Wachstumsplatten (2.2.5.) gut sichtbare Wachstumshöfe um die Ferrichrom und schwache um die Rhodotorulasäure Filterrondellen wenn die Dipyridylkonzentration im TY-Weichagar erhöht wurde. Es war anzunehmen, daß bei der fepA1/2 Mutanten die Wachstumshöfe deshalb besser zu erkennen waren, weil bei ihr auf Grund der

Mutation im Enterochelin Rezeptorgen (84) die hoch affine Eisen(III)-Versorgung mit Enterochelin beeinträchtigt war.

3.2.4. Charakterisierung der Albomycin resistenten Mutanten des Stamms H506 $r^-m^-(1)$ fepA1/2

Der Albomycin und T5 sensitive Stamm H506 $r^-m^-(1)$ fepA1/2 zeigte im Wachstumstest (Tab. 6, 2.2.5.) im Gegensatz zu H416 und H416 Transformanten keine gleichmäßigen Wachstumszonen um die Filterrondellen mit Ferrichrom und Rhodothorulasäure, sondern es bildeten sich um diese Filterrondellen Wachstumsringe. In unmittelbarer Nähe der Rondellen, also bei höheren Konzentrationen der Siderophore, war keine Wachstumsförderung zu erkennen. Die H506 Transformanten mit den pPF3 Abkömmlingen behielten zwar dieses Wachstumsverhalten um die Rhodothorulasäure Filterrondellen, um diejenigen mit Ferrichrom hatten sich allgemein wieder homogenere Wachstumszonen gebildet. Auch bei den Transformanten der Albomycin resistenten H506 $r^-m^-(1)$ fepA1/2 Klone, die mit Ferrichrom wuchsen, waren in der Regel homogene Wachstumszonen um die Filterrondellen zu erkennen (Tab. 6). Allgemein war die Intensität der Wachstumszonen um die Ferrichrom und Rhodothorulasäure Filterrondellen bei der fepA1/2 Mutante von H506 geringer als bei der aro^- Mutante von H416. Da die Eisenversorgung der Zellen mit Rhodothorulasäure viel schlechter erfolgte als mit Ferrichrom, war bei den Transformanten der Albomycin resistenten Klone zwar oft noch eine geringe Wachstumsförderung mit Ferrichrom zu erkennen, aber oft kein Wachstum mehr mit Rhodothorulasäure.

Die 16 Mutanten Ar1 bis Ar16, die auf Grund ihrer Albomycin Resistenz isoliert wurden (2.2.12.), konnten nach ihrer T5 Sensitivität und nach ihrem Wachstumsverhalten mit Ferrichrom, Rhodothorulasäure und Albomycin in sechs verschiedene Gruppen unterteilt werden. Die Mutanten einer Gruppe, die im Komplementationsversuch untersucht wur-

den, zeigten immer das gleiche Komplementationsmuster, so daß diesen Mutanten gleiche oder ähnliche Mutationen in einem DNS Bereich zugrunde lagen.

Gruppe 1: Die näher untersuchten Mutanten Ar1 und Ar14 von H506 r^-m^-(1) fepA1/2 der ersten Gruppe waren T5 und Albomycin resistent und zeigten keine Wachstumsförderung durch Ferrichrom, Rhodothorulasäure und Albomycin. Das Komplementationsmuster (Tab. 6) dieser Mutanten war annähernd identisch mit der Albomycin und T5 resistenten Mutante H416 ArIII/2 (3.2.2.), das heißt, die Mutation betraf auch hier fhuA. Nur die Plasmide pPF3/V1 und pPF3/SV2 konnten die Mutante zum Wachstum mit Rhodothorulasäure komplementieren.

Gruppe 2: Die Mutante Ar3 zeigte im Querstrichtest gegen T5, im Gegensatz zu allen anderen T5 senssitiven Mutanten, nur im näheren Bereich des T5 Ausstrichs Wachstumshemmung. Dies deutete auf eine Mutation in fhuA hin, die neben der Albomycin Resistenz bewirkte, daß T5 nicht mehr so gut infizieren konnte. Die Mutante Ar3 konnte ebenso wie Ar1 und Ar14 nicht mit Hilfe der getesteten Eisenkomplexverbindungen wachsen. Nur Plasmide, die fhuA vollständig enthielten, konnten diese Ar3 Mutation zur Albomycin Sensitivität komplementieren. Eine Komplementation zum Wachstum mit Ferrichrom gelang nur mit pPF3/V1 und eine zum Wachstum mit Rhodothorulasäure nur mit pPF3/V1 und pPF3/SV2. Dieses Komplementationsmuster zeigte, daß es sich bei der Mutante Ar3 auch um eine Mutation in fhuA handelte. Diese Mutation wirkte sich partiell auf die T5 Sensitivität der Zellen aus. Sie betraf aber hauptsächlich die Sensitivität gegenüber Albomycin und die Aufnahme der Siderophore. Auch hier zeigte die fhuA Mutation, vermutlich wegen eines polaren Effekts auf die Nachbargene (3.2.2.), einen Einfluß auf das Wachstum mit Rhodothorulasäure wie bei H416 ArIII/2 (3.2.2.).

Gruppe 3: Die Albomycin resistenten, T5 sensitiven Mu-

tanten der dritten Gruppe H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Ar2, Ar5 und Ar11 zeigten gutes Wachstum mit Ferrichrom, Rhodothorulasäure und Albomycin. Im Gegensatz zur Albomycin resistenten und T5 sensitiven Mutante H416 Ar2/2, die auch Albomycin zur Eisenversorgung heranziehen konnte, wurden diese Mutanten durch alle getesteten Plasmide mit intaktem fhuA Gen zur partiellen Albomycin Sensitivität komplementiert (Tab. 6, Abb. 15). Eine gute Komplementation zur Albomycin Sensitivität, bei der beim Wachstumstest der Wachstumshof verschwand und durch einen Hemmhof ersetzt wurde, erfolgte jedoch nur mit pPF3/V1 und ferner mit pFB103 und pFB101. Zur Komplementation der Mutationen Ar2, Ar5 und Ar11 zur vollständigen Sensitivität gegenüber Albomycin genügte also nicht fhuA allein, sondern es war mindestens noch der fhuB Genbereich notwendig, der distal von fhuA liegt und der bei pFB103 und pFB101 noch intakt aber bei pFB1 und pPF3/V1 del6-10 defekt war. Da diese Mutationen genau wie die Mutation Ar2/2 beim Stamm H416 nur die antibiotische Aktivität von Albomycin auf die Bakterienzelle beeinträchtigten nicht aber den Fe(III)-Transport mit den untersuchten Siderophoren und da diese Mutationen mit Plamsiden mit wenigstens intaktem fhuA und fhuB komplementiert wurden, war es wiederum unklar, ob die hier zugrunde liegende Mutation wirklich den fhu Bereich betraf. Wie bei der Mutante H416 Ar2/2 konnte auch bei den hier besprochenen Mutanten später gezeigt werden (11a), daß es sich bei ihnen um pepN Mutanten handelte. Diese pepN Mutation konnte aber wiederum mit pBR322 Abkömmlingen mit mindestens der intakten Gene fhuA und fhuB partiell, vermutlich wegen eines Gen-Dosis Effekts, zur Albomycin Sensitivität komplementiert werden.

Gruppe 4: Die Mutanten Ar8, Ar13 und Ar15 waren T5 sensitiv, Albomycin resistent und verwerteten Ferrichrom schlechter als der Wildtyp. Eine Wachstumsförderung mit Rhodothorulasäure war bei den Mutanten und bei den Trans-

formanten nicht mehr zu erkennen. Bei den Transformanten war allgemein auf den Testplatten außerhalb der Wachstumsbereiche im Vergleich zu den anderen Mutanten kein Hintergrundwachstum zu erkennen. Plasmide wie pPF3/SV1, pFB103 und pFB1, die fhuA intakt enthielten, komplementierten die Mutanten Ar8, Ar13 und Ar15 zur Albomycin Sensitivität und zu einem guten Wachstum mit Ferrichrom. Die Wachstumshöfe waren hier wegen des schlechten Hintergrundwachstums sehr gut zu erkennen. Eine Komplementation zum Wachstum mit Rhodothorulasäure war bei den Transformanten nie zu beobachten. Das hier vorliegende Komplementationsmuster deutete darauf hin, daß die Mutation zur Albomycin Resistenz wieder fhuA betraf. Sie hatte nicht nur Albomycin Resistenz zur Folge sondern beeinträchtigte auch die Aufnahme von Ferrichrom und Rhodothorulasäure. Es ist unbekannt, weshalb vor allem die Transformanten dieser Mutanten auf den Testplatten bei Eisenmangelbedingungen so gut wie kein Hintergrundwachstum mehr zeigten.

Gruppe 5: Bei 2 von 16 selektionierten Albomycin resistenten Mutanten, bei Ar6 und Ar10, lagen Mutationen in fhuB vor (Tab. 6). Sie waren T5 sensitiv und Albomycin resistent und wuchsen nicht mit Ferrichrom, Rhodothorulasäure und Albomycin. Eine partielle oder vollständige Komplementation zur Albomycin Sensitivität und zum Wachstum mit Ferrichrom erfolgte mit den Plasmiden pPF3/SV2, pPF3/SV3, pFB103, pFB101 und pFB102. Diese Plasmide hatten alle die intakte fhuB Region distal von fhuA, die bei den Plasmiden pFB1 und pPF3/V1 del6-10 sowie bei den pXC Plasmiden defekt war. Es ist hervorzuheben, daß die fhuB Mutationen durch pPF3/SV3 (Abb. 15) nur zur partiellen Albomycin Sensitivität komplementiert wurden, während das noch kleinere Plasmid pPF3/PV2 (Abb. 14, c, Deletion II) die fhuB Mutation von Ar6 vollständig komplementieren konnte (Tab. 4). Der fhuB Bereich erstreckte sich so, wegen der Komplementation von pPF3/PV2 nicht in das 3,5 Md Pst I Fragment von

pPF3/V1 hinein (Abb. 14, c). Jedoch geht fhuB auf der anderen Seite über das 0,93 Md Pst I Fragment von pPF3 oder pPF3/V1 hinaus, denn das Plasmid pPF3/PV4 beziehungsweise pPF3/PV4-1 (Abb. 14, d, Deletion IV), dem mit dem 4,5 Md Pst I Fragment von pPF3 gerade dieser Bereich fehlte, komplementierte die Ar6 Mutation nicht mehr (Tab. 4). Allerdings ist von diesem 4,5 Md Pst I Fragment höchstens der 0,5 Md große DNS Abschnitt zwischen der äußersten Cla I und der benachbarten Pst I Schnittstelle notwendig. Dieses Fragment schließt nämlich in pCF1 und pCF1/V1, die fhuB Mutationen komplementieren, die DNS Insertion in pBR322 ab (Abb. 7, d und e).

Gruppe 6: Unter 16 Albomycin resistenten H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Kolonien wurde ein Klon gefunden, der sich im Test wie ein fhuB Stamm verhielt, der aber durch die fhuB defekten Plasmide pFB1 und pPF3/V1 del6-10 sowie durch pFB101 und pFB102 zur Albomycin Sensitivität und zum Wachstum mit Ferrichrom komplementiert wurde. Dieser Klon wurde mit Ar12 bezeichnet. Anders als bei einem fhuB Stamm wurde die Ar12 Mutation von pFB5 und pFB103, bei denen Tn*5* direkt neben fhuA inseriert ist, nicht komplementiert (Tab. 6). Nach einer früheren Benennung wurde dieser Komplementationsgruppe, die zwischen fhuA und fhuB lokalisiert ist, die Bezeichnung fhuC gegeben. Diese Mutation in fhuC bei Ar12 betraf aber nicht nur das Wachstum mit Rhodothorulasäure (33), sondern sie verhinderte auch die Fe(III)-Versorgung mit Ferrichrom und bewirkte Albomycin Resistenz.

Tab. 6: Test verschiedener Eigenschaften von Albomycin resistenten Mutanten des Stamms H506 r^-m^-(1) fepA1/2 und deren Transformanten. Die Bestimmung der T5 und Albomycin Sensitivität erfolgte mit dem Querstrichtest, während der Wachstumstest mit Ferrichrom, Rhodothorulasäure und Albomycin mit Hilfe des Plattendiffusionstest durchgeführt wurde (2.2.5.).

Albomycin resistente Mutante von H506 r^-m^- fepA	Transformante (Plasmid)	Sensitivität gegenüber T5	Albomycin	Wachstum mit Ferrichrom	Rhodothorulasäure[1]	Albo-mycin[2]
WT-Alb.$^{sens.}$	-	+	+	+(R)	+o(R)	-
	pPF3/SV2	+	+	+(r)	+o(R)	-
	pPF3/SV3	+	+	+(r)	+o(R)	-
	pPF3/SV1	+	+	+(r)	+o(R)	-
	pPF3/V1 del6-10	+	+	+(r)	+o(R)	-
Ar1, Ar14 (Ar16)*	-	-	-	-	-	-
	pPF3/V1	+	+	+o(r)	+o(R)	-
	pPF3/SV2	-	-	-	+o(R)	-
	pPF3/SV3	-	-	-	-	-
	pPF3/SV1	+	+o	+oo(r)	-	-
	pFB103	+	+	+o(r)	-	-
	pFB101	+	+	+o(r)	-	-
	pPF3/V1 del6-10	+	+	+o(r)	-	-
Ar3	-	+o	-	-	-	-
	pPF3/V1	+	+	+o(R)	+o(R)	-
	pPF3/SV2	+o	-	-	+o(r)	-
	pPF3/SV3	+o	-	-	-	-
	pPF3/SV1	+	+o	-(3)	-	-
	pFB103	+	+	-(3)	-	-
	pFB101	+	+	-(3)	-	-
	pPF3/V1 del6-10	+	+o	- (3)	-	-
Ar2, Ar5, Ar11 (Ar4 und Ar9)*	-	+	-	+(R)	+o(R)	+o
	pPF3/V1	+	+	+(R)	+o(R)	-
	pPF3/SV2	+	-	+(r)	+o(R)	+o
	pPF3/SV3	+	-	+(r)	+o(R)	+o
	pPF3/SV1	+	+oo	+(r)	+o(r)	+o
	pFB103	+	+o	+(r)	+o(R)	-(4)
	pFB101	+	+o	+(r)	+o(R)	-(4)
	pFB1	+	+oo	+(r)	+o(R)	+o
	pPF3/V1 del6-10	+	+oo	+(r)	+o(R)	+o

Fortsetzung Tab. 6:

Albomycin resistente Mutante von H506 r⁻m⁻ fepA	Transformante (Plasmid)	Sensitivität gegenüber T5	Albomycin	Ferrichrom	Rhodothorulasäure[1]	Albo-2)mycin
Ar8, Ar13	-	+	-	+o(G)	-	-
Ar15	pPF3/V1	+	+o	+(4)	-	-
(Ar7)*	pPF3/SV2	+	-	-	-	-
	pPF3/SV3	+	-	-	-	-
	pCF1/V2	+	-	+o(G)	-	-
	pCF1/V3	+	-	+o(G)	-	-
	pPF3/SV1	+	+o	++(4)	-	-
	pFB103	+	+	++(4)	-	-
	pFB101	+	+	++(4)	-	-
	pFB1	+	+	++(4)	-	-
Ar6, Ar10	-	+	-	-	-	-
	pPF3/V1	+	+	+(r)	+o(r)	-
	pPF3/SV2	+	+	+(r)	+o(R)	-
	pPF3/SV3	+	+oo	+o(r)	-	-
	pPF3/SV1	+	-	-(3)	-	-
	pFB103	+	+	+oo(r)	-	-
	pFB101	+	+	+o(r)	-	-
	pFB102	+	+	+oo(r)	-	-
	pPF3/V1 del6-10	+	-	-(3)	-	-
	pFB1	+	-	-(3)	-	-
	pXC11, pXC17	+	-	-(3)	-	-
	pXC37, pXC46	+	-	-(3)	-	-
Ar12	-	+	-	-	-	-
	pPF3/SV2	+	+	+o(r)	+oo	-
	pPF3/SV3	+	-	-	-	-
	pPF3/SV1	+	+	+o(r)	-	-
	pFB103	+	-	-(3)	-	-
	pFB5	+	-	-(3)	-	-
	pFB101	+	+	+o(r)	-	-
	pFB102	+	+	+o(r)	-	-
	pPF3/V1 del6-10	+	+	+o(r)	-	-

Erläuterungen: ++, +, +o, - bezeichnen den Grad der Sensitivität gegen T5 und Albomycin beziehungsweise die Intensität der Wachstumszonen um die Filterrondellen, die mit den Eisenkomplexbildnern getränkt waren (siehe Tab. 5). R: ringförmige Wachstumsförderungszonen um die Filterrondelle (Radien des Wachstumsrings bei Ferrichrom: r_1 = 0,8 cm, r_2 = 1,2 cm und bei Rhodothorulasäure: r_1 = 1,1 cm, r_2 = 1,5 cm).

r: gleichmäßige Wachstumsförderungszone um die Filterrondelle (Radien bei Ferrichrom und Albomycin 1,2 bis 1,4 cm und bei Rhodothorulasäure 1,4 cm)
G: großer, jedoch nur wenig dichter Wachstumshof (Radien 1,8 bis 2 cm)
*: in Klammer = Mutante, die nicht im Komplementationstest untersucht wurde, die aber auf Grund ihrer Eigenschaften in diese Gruppe einzuordnen war.
1: oft Hemmung des Hintergrundwachstums zu beobachten, wenn mit Rhodothorulasäure kein Wachstum erfolgte.
2: bei Albomycin sensitiven Klonen war um die Albomycin Filterrondelle ein Hemmhof zu sehen (Radius: 1,2 - 1,4 cm).
3: um die Filterrondelle war eine partielle Hemmung des Hintergrundwachstums zu erkennen.
4: auf den Testplatten war fast kein Hintergrundwachstum zu erkennen. Die Wachstumsförderungszonen um die Ferrichrom Filterrondellen erschienen deshalb besonders intensiv.

3.3. Nachweis der Plasmid codierten Proteine

3.3.1. Nachweis der Plasmid codierten Proteine in Minizellen

Die Komplementationsversuche von Albomycin resistenten Mutanten zeigten (3.2.2., 3.2.4.), daß unmittelbar neben *fhuA* auf dem *E. coli* K12 Chromosom noch mindestens drei mit *fhuC*, *fhuD* und *fhuB* bezeichnete Komplementationsgruppen lagen, die für das Wachstum mit Hilfe von Ferrichrom und für die Sensitivität gegenüber Albomycin notwendig waren.

Die Plasmide pCF1/V1 und pPF3/V1, deren Deletionsplasmide und die Tn*5* Insertionsplasmide wurden zur Untersuchung der Proteine, die von der *fhu* Region codiert werden, in die *fhuA* Mutante des Minizellproduzenten H506 *fhuA*1 (2.2.13) beziehungsweise in die *fhuB* Mutante H506 r^-m^- *fepA*1/2 Ar6 (2.2.12.) transformiert. Die Transformanten wurden dann zur Isolierung der Minizellfraktionen (2.2.14.1.) herangezogen. Die Plasmid codierten Proteine konnten nach Markierung (2.2.14.2.) der in den isolierten Minizellen noch synthetisierten Proteine (64, 45) mit einem ^{14}C-Aminosäurengemisch in dem Fluorogramm der elektrophoretischen Proteinauftrennung sichtbar gemacht wer-

den (2.2.16., 2.2.17.).

3.3.1.1. Nachweis von Plasmid codierten Proteinen in Minizellen von H506 fhuA1 Transformanten

3.3.1.1.1. Nachweis des fhuA Genprodukts

Auf den ersten Fluorogrammen der elektrophoretischen Proteinauftrennungen im SDS-Polyacrylamidgel konnten das FhuA Protein und dessen Vorstufe (57), das FhuC Protein und die β-Laktamase und deren Vorstufe (72) im Gesamtminizellenprotein nachgewiesen werden.

Bei Minizellen mit pBR322 war auf dem Fluorogramm nur die β-Laktamase (27 K) und deren Vorstufe (30,5 K) zu sehen (Abb. 16, A, Spur b). Dagegen erschienen bei Minizellen mit dem Ampicillin Resistenzplasmid pCF1/V1 (Abb. 7, c), das genauso wie das Tetracyclin Resistenzplasmid pPF3/V1 (Abb. 7, a) alle untersuchten Mutationen in der fhu Region komplementierte, auf dem Fluorogramm eine dünne Bande mit einem Molekulargewicht von 81 K, eine dickere Proteinbande mit 78 K und eine mit 30 K (Abb. 16, A, Spur a). Die Proteinbanden mit 81 und 78 K verschwanden gleichzeitig im markierten Minizellgesamtprotein mit pCF1/V2 (Abb. 16, A, Spur f) — dagegen codierte dieses Plasmid noch für das 30 K Protein. Das Plasmid pCF1/V2 (Abb. 7, c) war durch die Deletion eines 1,65 Md Sal I Fragments aus pCF1 entstanden. Da pCF1/V2 eine fhuA Mutante nicht zur T5 Sensitivität komplementieren konnte (Tab. 2) ging der Verlust dieses Fragments auch mit dem Verlust eines Teils von fhuA einher. Das von pCF1/V1 noch codierte 78 K Protein stellte somit FhuA dar — die dünne Proteinbande mit 81 K repräsentierte dagegen die Vorstufe von FhuA (57). Beide Proteine erschienen nicht mehr in Minizellen mit pCF1/V2 (Abb. 16, A, Spur f).

In Minizellen mit pCF1/V3 (Abb. 16, A, Spur e) beziehungsweise pPF3/SV3 (Abb. 16, A, Spur d) wurde auch das 30 K Protein nicht mehr synthetisiert. Bei pCF1/V3 (Abb. 7, c)

fehlte im Vergleich zu pCF1/V1 genauso wie bei pPF3/SV3 im Vergleich zu pPF3 (Abb. 13, a) sowohl das 1,65 Md Sal I Fragment als auch das 1,25 Md Sal I Fragment. Der Verlust des 1,25 Md Sal I Fragments hatte also gleichzeitig den Verlust des Gens für das 30 K Protein zur Folge. Da Minizellen mit pPF3/SV1 (Abb. 13, a, Deletion I), bei diesem Plasmid fehlte das dem 1,25 Md Sal I Fragment benachbarte Sal I Fragment, noch das 30 K Protein bildeten, war gezeigt, daß das Gen für dieses Protein vollständig im 1,25 Md Sal I Fragment enthalten war. Dieses 30 K Protein konnte im folgenden als fhuC Genprodukt identifiziert werden (3.2.4.).

Auf dem Fluorogramm der Proteinauftrennungen von Minizellen mit pPF3/SV3 (Abb. 16, A, Spur d) fanden sich noch zwei weitere markierte Proteinbanden mit 46 K und 22,5 K. In H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Ar6 Minizellen mit pPF3/SV2 (Abb. 13, a, Deletion II), das im Vergleich zu pPF3/SV3 noch das 1,25 Md Sal I Fragment enthält, waren auf der Fluorographie eines anderen Gels neben dem 30 K Protein noch zusätzlich zwei Proteinbanden mit niederigerem Molekulargewicht (8 bis 10 K) zu erkennen (Abb. 16, B, Spuren a, b). Außerdem spalteten die 46 K und 22,5 K Proteinbanden auch jeweils in eine dünnere und dickere Bande auf. Da, wie festgestellt wurde, pPF3/V1 für keines der hier erwähnten Proteine codierte, lagen ihre Gene alle im 4,5 Md Pst I Fragment von pPF3, in der Nachbarschaft von fhuB. Sie waren im Gegensatz zu fhuB aber für die Eisenversorgung der Zellen mit Ferrichrom oder für die Sensitivität gegenüber Albomycin nicht notwendig. Da dieser fhuB benachbarte DNS Abschnitt Mutationen in dapD, das neben fhuB liegt (41), nicht komplementierte, könnte er nur noch den Genbereich, der zwischen fhuB und dapD liegt mit dem Gen popC enthalten. Die bisher besprochenen Daten über die im Minizellsystem nachgewiesenen Proteine der chromosomalen DNS Insertion von pPF3 sind in der Abbildung 17 zusammengefaßt.

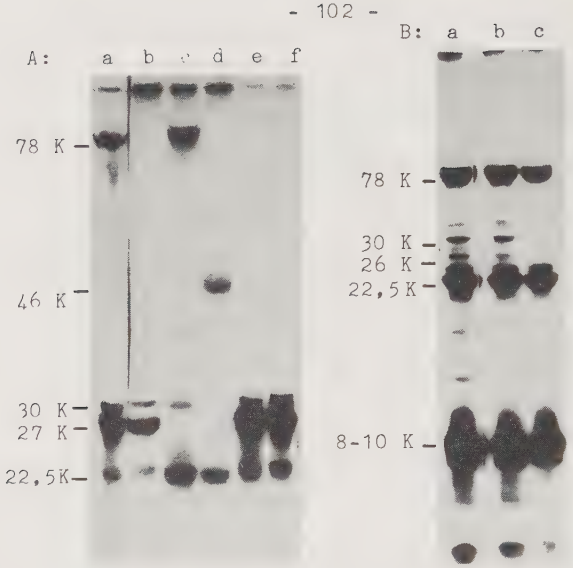


Abb. 16: A und B: Fluorographien der Auftrennungen von Minizellgesamtprotein in 11%/0,5% Acrylamid- Bisacrylamidgelen in Gegenwart von 0,1 % SDS. Die Elektrophorese des Gels A wurde, nachdem die Brophenolblaubande das Gel verlassen hatte, noch für 1,5 Std. weiter betrieben. Die Elektrophorese des Gels B wurde nur solang durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande das Ende des Gels erreicht hatte.Die Proben, die auf die Gele A und B aufgetragen wurden,waren getrennt voneinander markiert worden und zeigten auch einen unterschiedlich starken Einbau von Radioaktivität.
A: Es wurden mit ^{14}C-Aminosäuremix markierte Minizellen aus H506 fhuA1 Transformantenkulturen aufgetragen. Reihenfolge: a) Minizellen mit pCF1/V1; b) pBR322; c) pPF3/SV1; d) pPF3/SV3; e) pCF1/V3; f) pCF1/V2.
B: Hier wurden ^{14}C-markierte Minizellen von H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Ar6 Transformantenklonen aufgetragen. a) pPF3/SV2; b) pPF3/SV2, Markierung in Gegenwart von 200 µM Dipyridyl; c) pPF3/SV3;

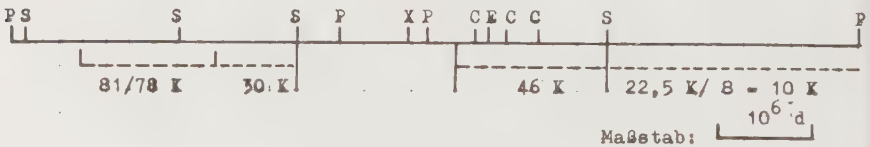


Abb. 17: Chromosomales DNS Insertionsfragment in der Pst I Schnittstelle von pBR322 bei pPF3. Die Genorte der im Minizellsystem nachgewiesenen Proteine wurden bestimmten

DNS Fragmenten zugeordnet. Vorstufe von FhuA = 81 K, FhuA = 78 K(Abgrenzungen nach den äußersten Tn5 Insertionen in fhuA); FhuC = 30 K Protein, codiert im 1.25 Md Sal I Fragment. Proteine, die der fhuA - fhuB Region benachbart sind und nicht im Zusammenhang mit der hier untersuchten Funktionen stehen :46 K Protein im ersten Abschnitt des 4,5 Md Pst I Fragments; 22,5 K und 8 bis 10 K Proteine im zweiten Abschnitt des 4,5 Md Pst I Fragments. C, E, P, S, und X kennzeichnen die Schnittstellen der Restriktionendonukleasen Cla I, Eco RI, Pst I, Sal I und Xho I. Die vertikalen längeren Linien kennzeichnen die möglichen äußersten Grenzen der 30 K, 46 K und 22,5 K beziehungsweise der 8 bis 10 K Proteine.

3.3.1.1.2. Transkriptionsrichtung von fhuA

In Minizellen mit Tn5 Insertionsplasmiden wurden zusätzlich zu den Plasmid codierten Proteinen auch noch die Transposon codierten Proteine synthetisiert (66). Die von Tn5 codierten 58 K, 54 K und 53 K Proteine traten im Fluorogramm als dünne, gut markierte Banden hervor (Abb.18,A, Spur e). Während jedoch das 49 K Protein von Tn5 nur eine schwach markierte Proteinbande bildete, verursachte die Tn5 codierte Neomycinphosphotransferase mit 26 K unterhalb der β-Laktamase, bei Minizellen mit pCF1 Plasmiden, die Schwärzung eines größeren Bereichs des Fluorogramms (hier nicht abgebildet). Bei der Untersuchung der Proteinbiosynthese in Minizellen mit Tn5 Insertionsplasmiden wurden deshalb vor allem solche Plasmide verwendet, bei denen ein oder mehrere Xho I Fragmente, einschließlich des Xho I Fragments mit dem Neomycinphosphotransferasegen von Tn5 deletiert waren (Abb.10).

Von den Plasmiden pTN3 und pTN5 mit Tn5 Insertionen in fhuA (Abb.8) wurden die Xho I Deletionsplasmide pTN3/6 und pTN5/2 (Abb. 10,b und c, Deletionen II) isoliert, denen nicht nur die Tn5 Xho I Fragmente, sondern auch ein Teil der pPF3/V1 oder pCF1/V1 DNS fehlte. Sowohl pTN3/6 als auch pTN5/2 codierten nicht mehr für das komplette FhuA und dessen Proform und auch nicht mehr für die Tn5 codierten Proteine. Dafür traten bei Minizellen mit pTN3/6 (Abb.18,A, Spur i) zwei dünne Banden auf mit etwa 68 K und bei Minizellen mit pTN5/2 (Abb. 18, A, Spur j) eine dünnere

Bande mit 42 K und eine dickere mit 39 K auf. Bei diesen Proteinen konnte es sich nur um auf Grund der Tn5 Insertion unvollständig synthetisierte Pro-FhuA und FhuA Proteine handeln. Da wegen der Größen der unvollständig synthetisierten Proteine die Initiationsstelle der Transkription näher am Tn5 Insertionsort von pTN5 als an jenem von pTN3 liegen mußte, war die Transkriptionsrichtung von fhuA nachgewiesen. Die Transkription erfolgte beginnend im 1,65 Md Sal I Fragment, in dem auch die Tn5 Insertion von pTN5 lokalisiert ist, bis weit in das benachbarte 1.25 Md Sal I Fragment hinein, in dem auch das Gen für das 30 000 d Protein liegt. Das 30 K Protein wurde in Minizellen mit den Deletionsplasmiden pTN3/6 und pTN5/2 wegen des Xho I Deletionen dieser Plasmide nicht synthetisiert.

3.3.1.1.3. Nachweis von fhuC

Bei den Komplementationsversuchen(3.2.4.) wurde die Albomycin resistente fhuC Mutante H506r⁻m⁻(1) fepA1/2 Ar12 gefunden, die zwar von den Tn5 Insertionsplasmiden pFB101, pFB1 und pFB102, aber nicht mehr von pFB103 und pFB5 zum Wachstum mit Ferrichrom und zur Albomycin Sensitivität komplementiert wurde . Die Tn5 Insertionsorte von pFB5 und pFB103 lagen im Gegensatz zu denen von pFB101 und pFB102 direkt neben dem fhuA Genort innerhalb des 1,25 Md Sal I Fragments (Abb.8). Es sollte nun geklärt werden, ob die Tn5 Insertion bei pFB5 und pFB103 das neben fhuA gefundene Gen für das 30 K Protein betraf. Das wäre dann der Fall, wenn fhuC für das 30 K Protein codieren würde.

Tatsächlich synthetisieten Minizellen mit den Xho I Deletionsplasmiden pFB103/1 (Abb. 18, A, Spur h), pFB103/110 (Abb. 18, B, Spuren g und h) und pFB5/6(Abb. 18, B, Spur b) im Gegensatz zu Minizellen mit pFB101/2 (Abb. 18, A, Spur g), pFB3/1 (Abb. 18,A, Spur f), pFB3/106 (Abb. 18, B, Spuren e und f) und pFB1/1 (Abb. 18, A, Spur e und B, Spur c und d) kein 30 K Protein mehr. Da bei pFB103/110 (Abb. 10, d, Deletion I) im Gegensatz zu den Plasmiden pFB103/1 und pFB5/6

(Abb. 10, d, e, Deletionen III) im Verhältnis zu pFB103 nur ein Tn*5* Xho I Fragment fehlte, konnte das Fehlen des 30 K Proteins in Minizellen mit pFB103/110 nur durch die Inaktivierung von *fhuC* auf Grund der Tn*5* Insertion erklärt werden, Die Tn*5* Insertionen von pFB1, pFB101, pFB3 (Abb.8) die alle außerhalb des 1.25 Md Sal I Fragments lagen, hatten dagegen keinen Einfluß auf die Synthese von FhuC.

Minizellen mit pFB1/1, pFB3/106, pFB103/110, denen im Verhältnis zu pFB1, pFB3 und pFB103 nur ein Tn*5* Xho I Fragment fehlte (Abb. 10, Deletionen I), synthetisierten noch die Tn*5* codierten 54 K und 58 K Proteine (Abb. 18).Dagegen wurden diese Proteine in Minizellen mit den Plasmiden pFB103/1 pFB101/2, pFB3/1 und pFB5/6, bei denen nicht nur beide Tn*5* Xho I Fragmente, sondern auch noch ein Teil der benachbarten Plasmid DNS fehlte (Abb. 10, Deletionen III), nicht mehr synthetisiert. Es war auch auffallend, daß Minizellen mit pFB3/1 und pFB5/6 (Abb. 18, B, a und b), also Plasmide mit großen Xho I Deletionen, mehr β-Laktamase Proform besaßen als Minizellen mit den Plasmiden pFB1/1 oder pFB3/110, denen nur ein Tn*5* Xho I Fragment fehlte. Bei Minizellen mit pFB3/1 und pFB5/6 war auch die Proform von FhuA gut repräsentiert.

3.3.1.1.4. *fhuD*

Auf dem Fluorogramm der Proteinauftrennung von Minizellen mit pFB1/1 (Abb. 18, A, e) war unterhalb der am stärksten markierten β-Laktamasebande deutlich eine schwach markierte Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 26 K zu erkennen, die bei Minizellen mit pFB3/1 (Abb. 18, A, f), mit pFB101/2 (Abb. 18, A, g), mit pBR322(Abb. 18,A, d) und mit pPF3/SV1 (Abb. 18, A, c) fehlte. Dagegen war diese Proteinbande auch schwach auf dem Fluorogramm der Auftrennung von Minizellen mit pPF3/V1 unterhalb der hier schon schwach markierten FhuC Bande zu erkennen (Abb. 18, A, Spur a). Da dieses Protein auch von pPF3/V1 codiert wurde, kam die Vermutung auf, daß es ein weiteres Protein der *fhu*

Region darstellen könnte, das auch für das Wachstum mit Ferrichrom und für die Sensitivität gegenüber Albomycin notwendig war. Das Protein wurde von Minizellen mit pFB3/1, pFB103/1 im Gegensatz von solchen mit pFB1/1 deshalb nicht synthetisiert, weil diese Plasmide aus den ursprünglichen Tn*5* Insertionsplasmiden durch eine Xho I Deletion entstanden waren, die über die Tn*5* DNS hinausging und sich bis zur Xho I Schnittstelle im 0,93 Md Pst I Fragment von pCF1/V1 oder pPF3/V1 erstreckte (Abb. 10, d, f, Deletionen III und h, Deletion I). Das 26 K Protein wurde später nach der Lokalisierung seines Gens mit FhuD bezeichnet.

3.3.1.1.5. Induktion von *fhuA* und *fhuC*

Die Transkription der Gene für die hochspezifischen Eisenaufnahmesysteme wird bei Eisenmangelbildungen im Medium induziert. Für die gemeinsame Regulation dieser Gene, auch der Gene der *fhuA* Region, wurde ein negativer Kontrollmechanismus vorgeschlagen (33,34). Es wurde nun untersucht, ob niedrige Eisenkonzentrationen im M9 Markierungsmedium auch in Minizellen, also ohne direkten Einfluß des Bakterienchromosoms, ein Induktion der Gene der *fhuA* Region bewirken.

Bei Eisenmangelbildungen, verursacht durch den Komplexbildner Dipyridyl im M9-Medium, war in Minizellen mit pFB1/1 und pFB3/106 und pFB103/110 mehr FhuA und FhuA Proform synthetisiert worden alsbei besserer Eisenversorgung(Abb. 18,B, c und h). Ebenso war bei Minizellen mit pFB1/1 und pFB3/106 eine leichte Induktion von *fhuC* zu verzeichnen. Keinen Einfluß hatte die Eisenkonzentration im Markierungsmedium dagegen auf die Expression der 58 K und 54 K Proteine, die von der restlichen Tn*5* DNS dieser Plasmide noch codiert wurden.
Es ist jedoch zu bemerken , daß bei parallel durchgeführten Induktionsversuchen mit 200µMDipyridyl im Markierungsmedium vor allem die Induktion von FhuC nicht immer so eindeutig wie hier ausfiel.

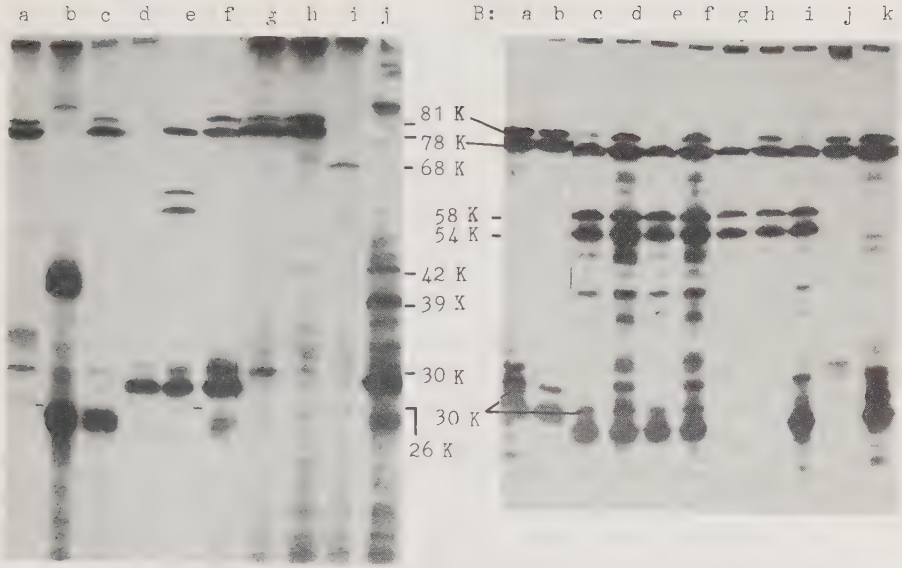


Abb. 18: A und B: Fluorographien der Auftrennungen von Minizellgesamtprotein in 15%/0,28% Acrylamid- Bisacrylamidgelen in Gegenwart von 0,1 % SDS. Es wurden jeweils mit ^{14}C-Aminosäuremix markierte Minizellproben aus verschiedenen H506 fhuA1 Transformantenkulturen aufgetragen.
A: Reihenfolge: Minizellen mit a) pPF3/V1; b) pPF3/SV3; c) pPF3/SV1; d) pBR322; e) pFB1/1; f) pFB3/1; g) pFB101/2; h) pFB103/1; i) pTN3/6; j) pTN5/2.
B: Reihenfolge: Minizellen mit a) pFB3/1; b) pFB5/6; c) pFB1/1; d) pFB1/1, Markierung mit 150 µM Dipyridyl im Medium; e) pFB3/106; f) pFB3/106, mit 150 µM Dipyridyl; g) pFB103/110; h) pFB103/110, mit 150 µM Dipyridyl; i) pFB5/130; j) pPF3/V1; k) pCF1/V1.

3.3.1.2. Nachweis von Plasmid codierten Proteinen in Minizellen von H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Ar6

Neben den Minizellen, die aus verschiedenen H506 fhuA1 Kulturen isoliert und zur Untersuchung der Plasmid codierten Proteinsynthese eingesetzt wurden, wurden für diese Untersuchungen auch Minizellen von H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Ar6 Transformantenklonen verwendet. Die Ar6 Mutation dieses Stamms wurde bei den Komplementationsversuchen distal von fhuA im fhuB Bereich lokalisiert (3.2.4.).

3.3.1.2.1. Nachweis von fhuD

Das in Minizellen mit pPF3/V1 oder mit pFB1/1 gefundene 26 K Protein (3.3.1.1.4.) wurde auch in Minizellen aus H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Ar6 Transformantenklonen mit pPF3/V1 del6-10 synthetisiert (Abb. 19, Spur f). pPF3/V1 del6-10 (Abb. 12, c, Deletion I) entstand aus pPF3/V1 durch eine kleine Deletion, welche die Xho I Schnittstelle von pPF3/V1 beinhaltete. Das Deletionsplasmid war genauso wie pFB1/1 und die pXC Plasmide nicht mehr in der Lage, eine fhuB Mutante zu komplementieren (Tab. 6, Mutationen Ar6 und Ar10). Da pPF3/V1 del6-10 aber neben FhuA, dessen Proform und FhuC auch noch das 26 K Protein vollständig codierte, stellte das 26 K Protein kein direktes fhuB Genprodukt dar. Auf Grund der Ausdehnung des fhuB Bereiches über das 0,93 Md Pst I Fragment von pPF3/V1 oder pCF1/V1 hinaus (Abb. 20, 3.2.4.), konnte das Gen für das 26 K Protein nur zwischen fhuB und fhuC liegen. Genau dieser Bereich einschließlich fhuB war bei der Albomycin resistenten Mutante H416 Ar4'/2 im Bakterienchromosom verändert (Tab. 5).

Minizellen mit pPF3/V1 del2-15 synthetisierten zwar noch die 81 K, 78 K und 30 K Proteine aber nicht mehr das 26 K Protein (Abb. 19, Spur e). Dafür war unterhalb der eigentlichen Stelle des 26 K Proteins auf dem Fluorogramm der Proteinauftrennung bei 24 K eine stärkere Markierung des Hintergrunds im Vergleich zu Minizellen mit pPF3/V1 del6-10 zu erkennen (Abb. 19, Spur f). Dieses 24 K Protein stellte vermutlich ein partielles FhuD Protein dar (FhuD = 26 K Protein). pPF3/V1 del2-15 war nach der Deletion eines großen Eco RI Fragments aus pPF3/V1 entstanden (Abb. 12, b, Deletion 1). Diese Deletion schloß die gesamte, nach den Komplementationsergebnissen eingegrenzte fhuB Region (3.2.4., Abb. 20) mit ein und endete nach der Pst I Schnittstelle des Pst I Fragments, das auch fhuA und fhuC beinhaltete. Da pPF3/V1 del2-15 aber noch ein partielles FhuD bildete, mußte die Transkription von fhuD noch innerhalb dieses Fragments in der Nachbarschaft von fhuC beginnen.

In dem Bereich des 3,5 Md Pst I Fragments, in dem das fhuD Gen vermutet wurde, liegen die Tn5 Insertionsorte von pFB101 und pFB102 (Abb.8). Minizellen mit den Deletionsplasmiden pFB101/150 und pFB102/50 (Abb. 10, i und j, Deletion I), denen nur ein Xho I Tn5 Fragment im Vergleich zu pFB101 und pFB102 fehlte, synthetisierten auch kein FhuD Protein (Abb.19, a, b, und c, d). Die bei diesen Proteinauftrennungen im Fluorogramm an dieser Stelle noch auftretende dünne Bande ist auch bei Minizellen mit pPF3/V1 del2-15 zu sehen, sie stellt also nur eine Hintergrundbande dar.

Schließlich konnte die unvollständig synthetisierte FhuD Proteinbande gut sichtbar gemacht werden in Minizellen mit pPF3/V1 del2-15/SV2(Abb. 14, b, DeletionI), dem das 1,65 Md Sal I Fragment mit Teilen von fhuA fehlte(Abb.19,k,l,m). Dagegen war FhuD in Minizellen mit pPF3/V1/SV2 (Abb.14,a, Deletion I) als vollständiges 26 K Protein neben FhuC synthetisiert worden (Abb.19, Spuren n,o). Ergänzend ist noch hinzuzufügen, daß Minizellen mit pBR322 kein Protein mit einem Molekulargewicht von 26 K synthetisierten (Abb.19, Spur g).

3.3.1.2.2. Suche nach FhuB

Die Fluorogramme der Proteinauftrennung von Minizellen mit Plasmiden, die Deletionen oder Tn5 Insertionen in der fhuB Region(Abb. 20) besitzen zeigten immer das Proteinmuster von Minizellen mit analogen fhuB$^+$ Plasmiden. Ein FhuB Protein war also in Minizellen in keinem Fall nachzuweisen. Auffallend war aber, daß Minizellen des Stamms H506 r^-m^-(1) fepA1/2 Ar6 mitpXC46 oder pXC37 genauso wie Minizellen mit pPF3/V1 del6-10 allgemein weniger FhuA, FhuC und FhuD synthetisierten als Minizellen mit pPF3/V1 (Fluorogramm hier nicht abgebildet). Die Plasmide pXC37 und pXC46 waren genauso wie pPF3/V1 del6-10 durch kleine Deletionen um die Xho I Schnittstelle im FhuB Bereich von pPF3/V1 herum entstanden (Abb. 12, a, Deletionen III und IV).

Ein Effekt von fhuB auf die Expression von FhuC und FhuD

war auch beim Vergleich der Proteinmuster von Minizellen mit pPF3/V1 del2-15/SV2 (Abb. 19, k, l, m) mit dem des Stamms mit pPF3/SV2 (Abb. 19, n, o) zu erkennen. Minizellen mit pPF3/V1 del2-15/SV2 synthetisierten bei gleichen Bedingungen deutlich weniger FhuC und FhuD als Minizellen mit pPF3/V1/SV2. Dieses Plasmid besitzt im Vergleich zum vorigen noch die Fähigkeit, fhuB Mutanten zu komplementieren (Tab. 4). Minizellen mit pPF3/V1/PV2 (Abb. 14, c, Deletion II), das nur noch fhuB Mutanten komplementieren konnte (Tab. 4), also nicht mehr für FhuA, FhuC und FhuD codierte, synthetisierten nur noch ein 37 K Protein (Abb. 19, h), das auch in Minizellen mit pBR322, mit pPF3/V1 del2-15/SV2 oder pPF3/V1/SV2 (Abb. 19, Spuren k bis o) zu finden war. Dieses Protein stellt das Tet-Protein in der Cytoplasmamembran dar (63), das von der Tetracyclin Resistenzregion von pBR322 codiert wird. Es stellte sich heraus, daß bei Fluorographien von nicht mit SDS-gekochten Proteinauftrennungen die gesamte Markierung, die bei gekochten Proben in der Geltasche geblieben war, an die Stelle des 37 K Proteins wanderte. Auf dem Fluorogramm war direkt oberhalb dieser Tet-Proteinbande bei Auftrennungen von Minizellen mit pBR322, pPF3/V1 del2-15/ /SV2 und pPF3/V1/SV2 noch eine Proteinbande zu erkennen, die bei solchen mit pPF3/V1/PV2 fehlte – warum ist unbekannt. Aber Minizellen mit pPF3/V1/PV2 ließen auch bei stärkerer Markierung in keinem Fall ein fhuB Genprodukt erkennen (Abb. 19, Spur j).

3.3.1.2.3. Inaktivierung von fhuC bei pFB500/101

Minizellen mit pFB500/101 (Abb. 11, a) synthetisierten zwar noch FhuA, die FhuA Vorstufe und FhuD, aber nicht mehr FhuC (Abb. 19, Spuren p und q). Es war hier auch kein partielles FhuC Protein nachzuweisen. pFB500/101 enthielt den Rest der Tn5 Insertion von pFB5/101, ein Ampicillin Resistenzplasmid, an der homologen Stelle des Tetracyclin Resistenzplasmids pPF3/V1. Es konnte in Minizellen mit pFB500/101 jedoch auch kein partielles FhuC nachgewiesen werden, das von Minizellen mit pFB5/101 möglicherweise im Fluorogramm durch die Markierung der ß-Laktamase verdeckt worden wäre.

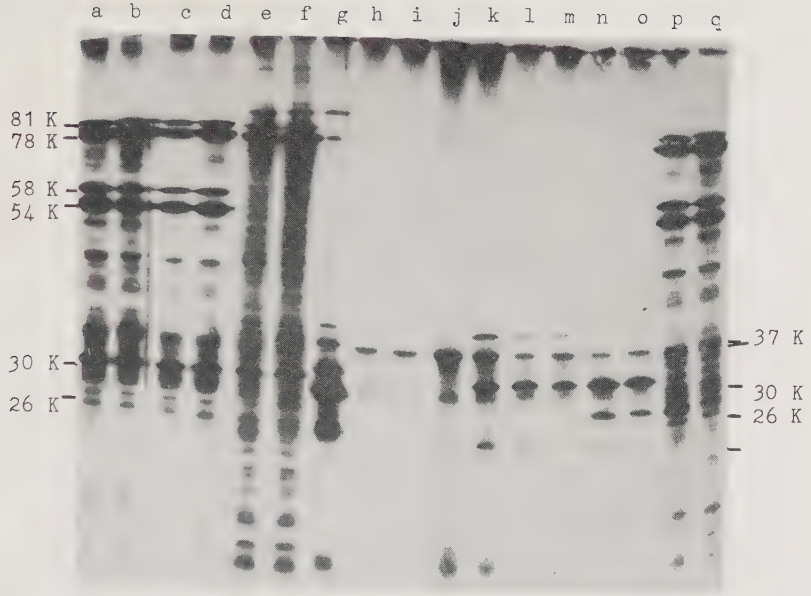


Abb. 19: Fluorographie der Auftrennung von Minizellgesamtprotein in 15%/0,28% Acrylamid-Bisacrylamidgelen in Gegenwart von 0,1 % SDS. Es wurden jeweils mit ^{14}C-Aminosäuremix markierte Minizellproben aufgetragen, die aus verschiedenen H506 r⁻m⁻(1) fepA1/2 Ar6 Transformantenkulturen (2.2.14.) isoliert wurden. Auftragreihenfolge: Minizellen mit a) pFB101/50; b) pFB101/50, Markierung in Gegenwart von 200 µM Dipyridyl; c) pFB102/50; d) pFB102/50, mit 200 µM Dipyridyl; e) pPF3/V1 del2-15; f) pPF3/V1 del6-10; g) pBR322; h) pPF3/V1/PV2; i) pPF3/V1/PV2, mit 200 µM Dipyridyl; j)pPF3/PV2, mit 200 µM Dipyridyl, 4 x stärkere Markierung; k) pPF3/V1 del2-15/SV2, mit 200 µM Dipyridyl, 4 x stärkere Markierung; l) pPF3/V1 del2-15/SV2, mit 200 µM Dipyridyl; m) pPF3/V1 del2-15/SV2; n) pPF3/V1/SV2; o) pPF3/V1/SV2, mit 200 µM Dipyridyl; p) pFB500/101; q) pFB 500/101, Markierung mit 200 µM Dipyridyl.

3.3.1.3. Zusammenfassung: Proteine der *fhu* Region, die im Minizellsystem nachgewiesen wurden

Die Abb. 20 zeigt den chromosomalen DNS Abschnitt von *E. coli* K12, der in pPF3/V1 in der pBR322 DNS integriert

enthalten ist . Die Gene fhuA, fhuC und fhuD wurden nach den Orten der äußersten Tn5 Insertionen, die diese Gene inaktivierten, abgegrenzt. in Minizellen mit Plasmiden, die fhuA vollständig enthielten, erschienen als fhuA Genprodukte ein 81 K und 78 k Protein(3.3.1.1.1.). Die Tn5 Insertionsplasmide pTN5 und pTN3 codierten dagegen nur noch die partiellen fhuA Produkte mit 42 K, 39 K, beziehungsweise 68 K (3.3.1.1.2.). Auf Grund der Größe dieser partiellen FhuA Proteine konnte die Transkriptionsrichtung von fhuA nachgewiesen werden.

Das Gen fhuC für das 30 K FhuC Protein (3.3.1.1.3.).lag innerhalb des 1.25 Md Sal I Fragments neben fhuA.Dieses 30 K Protein wurde in Minizellen mit pFB5 und pFB103 nicht mehr synthetisiert (3.3.1.1.3., 3.3.1.2.3.). Bei diesen Plasmiden lagen die Tn5 Insertionsorte innerhalb von fhuC. Partielle fhuC Proteine konnten aber nicht nachgewiesen werden.

Das 26 K FhuD Protein wurde in Minizellen synthetisiert, die Plasmide mit intaktem fhuD enthielten(3.3.1.1.4.). Minizellen mit pPF3/V1 del1-15 synthetisiert auf Grund einer Deletion jedoch nur ein unvollständiges FhuD mit 24 K (3.3.1. 2.1.). Außerdem codierten die Tn5 Insertionsplasmide pFB101, pFB102 nicht mehr für das 26 K FhuD Protein. Diese Ergebnisse zusammen zeigten, daß fhuD zwischen einer Sal I Schnittstelle und einer Pst I Schnittstelle in der Nachbarschaft von fhuC lokalisiert war. Die Transkriptionsrichtung mußte, auf Grund des partiellen FhuD,mit der von fhuA übereinstimmen.

Die maximale beziehungsweise minimale Ausdehnung von fhuB wurde zwar mit Hilfe der Deletionsplasmide und Tn5 Insertionsplasmide durch Komplementionsversuche ermittelt (3.2.4.) — es konnte in Minizellen aber kein fhuB Genprodukt nachgewiesen werden(3.3.1.2.2.). Es wurde jedoch gezeigt, daß Plasmide mit kleinen Deletionen in fhuB in Minizellen auch weniger FhuA, FhuC und FhuD exprimieren.

Schließlich wurde in Minizellen mit verschiedenen Plas-

miden die Expression von fhuA und fhuC im Vergleich zu Tn5 codierten Proteinen bei Eisenmangelbildungen erhöht (3.4.1.1.5.).

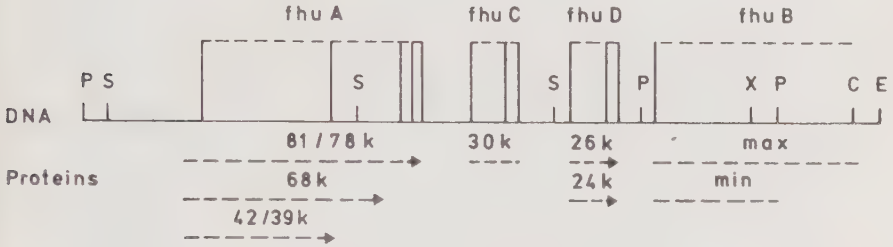


Abb.20: Physikalische Karte des chromosomalen DNS Abschnittes, der in pPF3/V1 enthalten ist. Die Genorte fhuA, fhuC und fhuD sind dargestellt, abgegrenzt durch die Orte der äußersten Tn5 Insertionen (senkrechte Linien), die diese Gene inaktivierten. Die Ausdehnung von fhuB konnte in Komplementationsstudien ermittelt werden (3.3.4.). Unterhalb der einzelnen Genbereiche sind die für diese Gene im Minizellsystem nachgewiesenen Proteine oder partielle Proteine eingezeichnet. Außerdem ist die minimale beziehungsweise maximale Ausdehnung des fhuB Gens eingezeichnet. C, E, P, S, X kennzeichnen die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Cla I, Eco RI, Pst I, Sal I und Xho I.

3.3.2.Nachweis der Plasmid-codierten Proteine im Maxizellsystem

Die Untersuchung der Plasmid codierten Proteinsynthese im Maxizellsystem erfolgte nach der UV-Inaktivierung einer E. coli K-12 uvrA Mutante mit dem zu untersuchenden Plasmid (67). Dabei mußte die Dosis des UV-Lichtes so gewählt werden, daß das Bakterienchromosom inaktiviert , die Plasmide aber zum Teil noch aktiv waren (2.2.15.1.). Die pBR322 Abkömmlinge, die "relaxed" replizieren (7), komnten während einer 16 Stunden langen Nachinkubation noch repliziert werden.Die so behandelten Zellen wurden dann für den Nachweis der Plasmid codierten Proteine mit einem ^{14}C-Aminosäuregemisch markiert (2.2.15.2.).

Da man bei diesem System mit ganzen Zellen arbeitete, konnten die markierten Maxizellen zur Isolierung der Gesamtmembran und der äußeren Membran der Zellen eingesetzt werden(2.2. 15.3.), das heißt, mit dem Maxizellsystem konnten die Plasmid codierten Proteine nach der Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel entweder der äußeren Membran , der Gesamtmembran und gegebenenfalls der Cytoplasmamembran zugeordnet werden.

Es zeigte sich, daß sich das Bakterienchromosom des Stamms H506 fhuA1 uvrA (2.2.13.) mit den verschiedenen Plasmiden sehr unterschiedlich bei gleichen Bedingungen inaktivieren ließ. Außerdem wurden bei guter Inaktivierung immer noch zahlreiche Zellproteine markiert. Plasmid codierte Proteine traten aber bei einigen Versuchen deutlich in den Membranfraktionen hervor.

3.3.2.1. Membranassoziation von Plasmid codierten Proteinen

Maxizellen, die keine Proteine enthielten, konnten durch die hier verwendete UV Dosis (2.2.15.1.) gut inaktiviert werden. Sie zeigten bei der Markierung nur einen sehr schwachen Einbau von ^{14}C-Aminosäuren in Zell- und Membranproteine (Abb. 21, A, Spuren a und f). Dagegen zeigten Maxizellen mit pBR322 schon einen wesentlich besseren Plasmid unspezifischen Einbau von Radioaktivität in Gesamtzellproteine und Membranproteine (Abb. 21, A, b und g). In der Gesamtmembran von Maxizellen mit pBR322 trat aber unterhalb des relativ gut markierten Hauptproteins OmpA das von pBR322 codierte Tet-Protein (63) deutlich hervor.

Bei Maxizellen mit pPF3/V1 (Abb. 7, b) war das 78 K FhuA Protein genauso wie bei Maxizellen mit dem Ampicillin Resistenzplasmid pCF1/V1 schon auf der Photographie der gefärbten Proteinauftrennung der Gesamtmembranfraktion oder der äußeren Membranfraktion als dicker schwarzer Fleck sichtbar. Die Fluorographie zeigte jedoch zusätzlich in der Gesamtmembranfraktion von Maxizellen mit pPF3/V1 unterhalb des Tet-Proteins zwei Proteinbanden mit 30 K und 26 K (Abb. 21. A, Spur h). Diese Protein-

banden erschienen aber nicht in der äußeren Membranfraktion (Abb. 21, A, Spur i). Das 30 K Protein erschien auch nicht in der Gesamtmembranfraktion von Maxizellen mit pBR322 (Abb. 21, A, Spur g). Dies zeigte, daß dieses Protein identisch ist mit dem 30 K FhuC Protein, das von pPF3/V1 codiert wird (Abb. 20). Es ist auch möglich, daß die stark markierte Proteinbande unterhalb der 30 K Bande auf dem Fluorogramm das 26 K FhuD Protein darstellt. Beide Proteine traten auch in der Gesamtmembran von Maxizellen mit pPF3/V1 (Abb. 21, A, j) auf. Außerdem konnte in einem späteren Versuch bestätigt werden, daß diese Proteine nur in der Gesamtmembran und nicht in der äußeren Membran von Maxizellen mit pCF1/V1 vorkamen (Abb. 21, B, Spuren b und c).

Wenn diese Proteine nicht in der äußeren Membranfraktion, sondern in der Gesamtmembranfraktion enthalten waren, so bedeutete dies, daß sie in der Cytoplasmamembran lokalisiert waren, denn bei der Isolierung der äußeren Membran wurde die Cytoplasmamembran durch Triton X-100 Behandlung (69) aus dem Maxizellysat in Gegenwart von $MgCl_2$ extrahiert (2.2.15.3.). Nach diesen Ergebnissen konnte also vor allem das FhuC Protein in der Cytoplasmamembran lokalisiert werden.

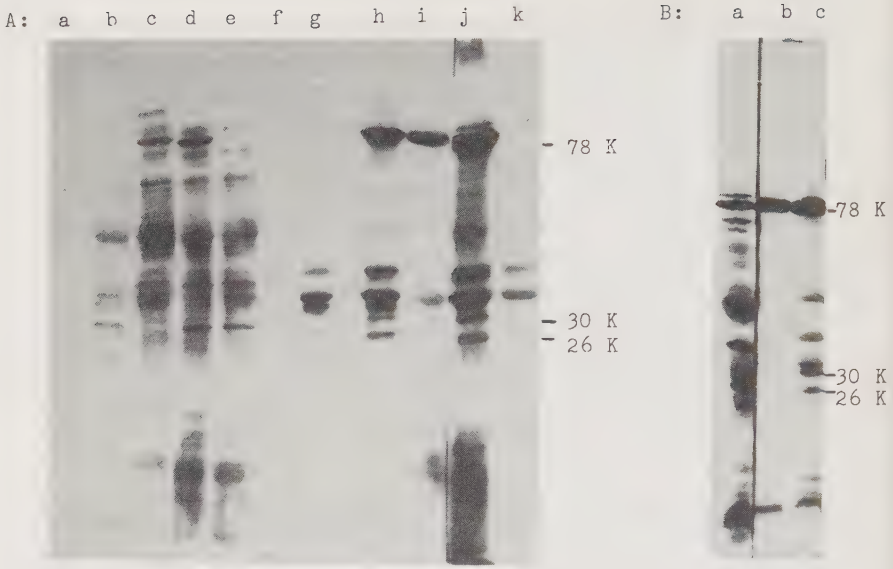


Abb. 21: A und B: Fluorographien der elektrophoretischen Proteinauftrennungen im 11%/0,2% Polyacrylamidgel (2.2.16.) von Maxizellgesamtprotein, von Gesamtmembranprotein und Protein der äußeren Membran (2.2.15.3.) nach der Markierung mit einem ^{14}C- Aminosäuregemisch (2.2.15.2.). Es wurden die Proteine von verschiedenen H507 fhuA1 Transformanten aufgetragen. Reihenfolge:
Abb. A: a) H507 fhuA1, Gesamtzellprotein; b) H507 fhuA1 pBR322, Gesamtzellprotein; c) H507 fhuA1,pPF3/V1, Gesamtzellprotein; d) H507 fhuA1 pCF1/V1, Gesamtzellprotein; e) H507 fhuA1 pCF1/V2, Gesamtzellprotein; f) H507 fhuA1 Gesamtmembranprotein; g) H507 fhuA1 pBR322, Gesamtmembran; h) H507 fhuA1 pPF3/V1, Gesamtmembran; i) wie zuvor, äußere Membran; j) H507 fhuA1 pCF1/V1, Gesamtmembran; k) H507 fhuA1 pCF1/V2, Gesamtmembran.
Abb. B: H507 fhuA1 mit a) pCF1/V1, Gesamtzellprotein; b) pCF1/V1, äußere Membran ; c) wie zuvor jedoch Gesamtmembran.

4. Diskussion

4.1. Klonierung der fhuA Region in pBR322

Das Plasmid pLC4-43 der Clarke und Carbon Genbank (20) enthält den chromosomalen Bereich von E. coli K12, der auf der 100 Min. Genkarte des E. coli K12 Chromosoms (2) bei 3,5 Min. liegt. Gekoppelt mit ColE1 DNS liegen auf ihm die Gene mrcB (75) für das Penicillinbindeprotein 1b und fhuA, das für den Rezeptor für Ferrichrom, Albomycin, T1, ϕ80, T5 und Colicin M in der äußeren Membran codiert. pLC4-43 wird wie alle Plasmide mit der Replikationsregion von ColE1 "relaxed" repliziert, das heißt, es liegt in 10 bis 20 Kopien in der Zelle vor. In der äußeren Membran von H416, transformiert mit pLC4-43, konnte viel mehr FhuA Protein nachgewiesen werden wie beim nicht transformierten Stamm (26). Die erhöhte Kopienzahl des fhuA Gens verursachte wegen des Gen-Dosis Effekts auch eine vermehrte Synthese von FhuA. Es konnte auch gezeigt werden, daß auf pLC4-43 noch Genbereiche liegen, die neben fhuA auch für die Wirksamkeit des Eisen(III)-Hydroxamat-Sideromycins Albomycin notwendig sind (26).

Schon 1976 wurde die Bedeutung des chromosomalen Bereichs neben fhuA (16) für den Ferrichrom-Fe(III) Transport und die Albomycin Sensitivität der Zellen erkannt und mit analogen sid Mutanten bei Salmonella typhimurium (46) in Beziehung gebracht. Zwischen fhuA und dapD auf dem E. coli K12 Chromosom konnte mit Hilfe von Transduktions- und Komplementationsversuchen die von fhuA unabhängige Transkriptionseinheit fhuB nachgewiesen werden, die für eine Fe(III)-Ferrichrom und Albomycin Aufnahmekomponente in der Cytoplasmamembran codieren sollte (41). Zwischen fhuA und fhuB wurde ein chromosomaler Bereich fhuC vermutet, der nur für die Aufnahme von Fe(III) mittels Rhodothorulasäure notwendig sein sollte.

Die chromosomalen DNS Bereiche von pLC4-43 mit der fhu Region wurden nach partiellem Pst I beziehungsweise Cla I

Verdau in das Plasmid pBR322 kloniert und zwar so, daß bei pPF3 die Ampicillin Resistenzregion und bei pCF1 die Tetracyclin Resistenzregion inaktiviert wurde (3.1.1.). Beide Plasmide, sowie ihre Verkleinerungsformen pPF3/V1 und pCF1/V1 (3.1.3.1.),konnten die Mutation von H416 fhuA13, die nicht nur fhuA sondern auch die benachbarten Genbereiche für die Ferrichrom und Albomycinaufnahme betraf (3.1.1.), bezüglich T5 Sensitivität und Wachstum mit Hilfe von Ferrichrom und Rhodothorulasäure komplementieren. Es war anzunehmen, daß in dem gemeinsamen DNS Abschnitt der chromosomalen Insertion dieser Plasmide (Abb. 22) alle Genbereiche der fhu Region integriert waren, die für die Aufnahme dieser Hydroxamsäureverbindungen notwendig waren.

4.2. Lokalisierung von fhuA

Mit Hilfe von Tn5 Insertionsplasmiden (Abb. 8, 27) wurde auf der physikalischen Karte des abgebildeten DNS Abschnitts (Abb. 22) unter anderem das Gen fhuA genau lokalisiert. Tn5 Insertionen, welche fhuA inaktivierten, konnten in zwei benachbarten Sal I Fragmenten, einem größeren mit 1,65 Md und einem kleineren mit 1,25 Md, lokalisiert werden. Das Gen fhuA erstreckt sich über mindestens 1,45 Md DNS. Vergleicht man die Codierungskapazität dieses Bereichs mit der Größe von FhuA mit etwa 80 K, so stimmen diese Werte gut miteinander überein, wenn man für eine Aminosäure ein durchschnittliches Molekulargewicht von 110 d berechnet. Es ist jedoch zu betonen, daß die äußerste Tn5 Insertion im grösseren Sal I Fragment beim Plasmid pTN4 wohl im Bereich der fhuA Promotorregion liegt, denn die Transformanten der T5 resistenten Mutante H508 fhuA1 waren im Gegensatz zu allen anderen Transformanten mit Plasmiden mit Tn5 Insertionen in fhuA partiell T5 sensitiv (3.1.3.2.1.).

Im Minizellsystem wurde bei Plasmiden mit intaktem fhuA neben dem 78 K FhuA Protein noch ein zweites größeres Protein mit 81 K nachgewiesen, das jedoch in viel geringeren Mengen als FhuA synthetisiert wurde (3.3.1.1.1.).

Dieses Protein wurde in Minizellen mit Plasmiden, die nicht mehr für FhuA codierten, auch nicht mehr synthetisiert. Es handelte sich bei dem 81 K Protein um die Proform von FhuA (57, =FhuA mit seinem Signalpeptid), welche nach einer Hypothese (51) die Membranassoziation des Proteins während seiner Synthese vermittelt.

Minizellen mit pTN3 (Tn*5* Insertion in *fhuA*, im 1,25 Md Sal I Fragment — Abb. 22) synthetisierten keine 81 K und 78 K Proteine mehr. Dagegen traten auf den Fluorogrammen der Proteinauftrennungen zwei eng benachbarte Banden mit 68 K auf (3.3.1.1.2.). Diese Banden konnten auf Grund der Lage der Tn*5* Insertionen nur als partiell synthetisierte FhuA und Pro-FhuA Proteine gedeutet werden, welche wegen ihrer von FhuA und Pro-FhuA unterschiedlichen Größe im SDS-Polyacrylamidgel ein etwas anderes Wanderungsverhalten zeigten als die vollständigen Proteine zueinander. Genauso konnten in Minizellen mit pTN5 (Tn*5* Insertion in *fhuA*, im 1,65 Md Sal I Fragment — Abb. 22) ein 39 K Protein und ein in geringeren Mengen synthetisiertes 42 K Protein wiederum nur als unvollständig synthetisiertes FhuA und dessen Proform gedeutet werden. Diese Proteine wurden in Minizellen in größeren Mengen gebildet als die 68 K Proteine.

Die Größe dieser unvollständig synthetisierten Proteine und die Lage der Tn*5* Insertionen ergaben, daß die Transkription von *fhuA* im 1,65 Md Sal I Fragment beginnt, etwa bei der Tn*5* Insertionsstelle von pTN4, und sich weit bis in das 1,25 Md Sal I Fragment erstreckt (Abb. 22).

Minizellen, die bei besonderen Eisenmangelbedingungen markiert wurden, synthetisierten im gleichen Zeitraum eindeutig mehr FhuA und mehr Pro-FhuA als Minizellen, denen mehr freies Eisen zum Wachstum zur Verfügung stand (3.3.1.1.5.). Eine Transkriptionskontrolle von *fhuA* konnte also auch in Minizellen, die keine chromosomale Bakterien DNS mehr beherbergten (64), nachgewiesen werden. Diese Regulation könnte darauf beruhen, daß bei der Abschnürung der

Minizellen von den Mutterzellen, die bei relativ guter Eisenversorgung im TY-Medium gezogen werden, bakterielles von fur bestimmtes Repressorprotein (34) teilweise gebunden an die Operatorregion der Plasmid DNS in die Minizellen überwechselt. Dort könnte dann das Repressorprotein seine regulatorische Wirkung entfalten. Ein Plasmid-DNS abhäniges Überwechseln von DNS assoziierten Proteinen in Minizellen ist für die DNS abhängige RNS Polymerase, sowie für das photoreaktivierende Enzym nachgewiesen (64).

4.3. Lokalisierung von fhuC

In Minizellen mit den Plasmiden pPF3/V1 und pCF1/V1 sowie mit den Deletionsplasmiden, die noch mindestens das 1,25 Md Sal I Insertionsfragment enthielten (Abb. 22), wurde immer ein 30 K Protein in solchen Mengen synthetisiert, daß es das Fluorogramm zwar schwächer als FhuA aber immer noch sehr gut schwärzte (3.3.1.1.1.). Dieses Protein, das nur durch radioaktive Markierung in den Gelen nachgewiesen werden konnte, wurde dagegen von den Tn5 Insertionsplasmiden pFB103 und pFB5, bei denen die Tn5 Insertionen zentral im 1,25 Md Sal I Fragment lagen, etwa 0,22 Md voneinander entfernt, nicht mehr codiert (3.3.1.1.3.).

HB101 fhuA13 Transformanten mit pFB103 und pFB5 waren zwar T5 sensitiv aber weiterhin Albomycin resistent und konnten nicht mit Hilfe von Ferrichrom und Rhodothorulasäure wachsen. Außerdem wurde bei der Isolierung von Albomycin resistenten Mutanten von H416 und H506 r^-m^-(1) fepA1/2 unter 23 im Komplementationstest untersuchten Mutanten eine Mutante nämlich H506 r^-m^- fepA1/2 Ar12 gefunden, die nur dann zur Albomycin Sensitivität und zum Wachstum mit Ferrichrom komplementiert wurde, wenn das transformierte Plasmid für das 30 K Protein codierte (3.2.4.). Dieses 30 K Protein, das also für die Wirksamkeit des Antibiotikums Albomycin und für das Wachstum

mit Hilfe von Ferrichrom als einzige Eisenquelle unbedingt erforderlich war, wurde in Anlehnung an die eingeführte Nomenklatur mit fhuC bezeichnet (41). Da in Minizellen mit den Tn5 Insertionsplasmiden pFB103 und pFB5 kein partielles FhuC Protein nachweisbar war, ist die Transkriptionsrichtung von fhuC noch unbekannt.

Mit Hilfe des Maxizellsystems wurde gezeigt, daß das 30 K Protein zwar in der Gesamtmembranfraktion der Zellen, nicht aber in der äußeren Membran enthalten war (3.3.2.1.). Dies bedeutete, daß FhuC als Proteinbestandteil der Cytoplasmamembran eine der schon lange postulierten Aufnahmekomponenten für Fe(III), gebunden an Ferrichrom oder Rhodothorulasäure, darstellt, die neben fhuA im Bakterienchromosom codiert werden.

FhuC konnte genauso wie FhuA in Minizellen bei Eisenmangelbedingungen induziert werden (3.3.1.1.5.). Die Induktion fiel jedoch schwächer und weniger reproduzierbar als jene von FhuA und dessen Proform aus. In den Proteinauftrennungen der markierten Minizellproteine konnte auch keine Proform von FhuC nachgewiesen werden.

Wenn man wie bei fhuA die Größe der DNS, die für FhuC codiert, berechnet, so ergibt sich ein Molekulargewicht von etwa 0,55 Md; das heißt, fhuC würde etwa doppelt soviel Platz auf den Plasmiden beanspruchen wie in der Abbildung 22 für fhuC nach den Orten der äußersten Tn5 Insertionen eingezeichnet wurde. Auch wenn sich fhuA noch etwas weiter in Richtung fhuC und fhuD etwa bis zur Sal I Schnittstelle erstreckte, wäre es möglich, daß zwischen fhuA und fhuC oder / und fhuC und fhuD noch ein kleiner insgesamt 0,1 bis 0,2 Md großer DNS Abschnitt liegt, dessen Bedeutung nicht bekannt ist.

4.4. Lokalisierung von fhuD

Minizellen mit pPF3/V1, mit dem Tn5 Insertionsplasmid pFB1/1 (Abb. 10, f, Deletion I) oder mit dem Deletionsplasmid pPF3/V1 del6-10 (Abb. 12, c, Deletion I) syntheti-

sierten im Gegensatz zu Minizellen mit pFB101 und pFB102 ein 26 K Protein, das jedoch nach der Schwärzung des Fluorogramms noch schwächer als FhuC exprimiert wurde (3.3.1.1.4., 3.3.1.2.1.). Die Tn*5* Insertion bei pFB101 und pFB102 (Abb. 8), die zwischen einer Pst I und Sal I Schnittstelle lokalisiert waren (Abb.22), mußten sich innerhalb des Gens für das 26 K Protein befinden, da diese Plasmide das 26 K Protein nicht mehr codierten (3.3.1.2.1.). Die Tn*5* Insertion bei pFB1/1, welche in dem benachbarten o,93 Md Pst I Fragment lag , sowie Deletionen in diesem Pst I Fragment wie bei pPF3/V1 del6-10 betrafen die Synthese des 26 K Proteins nicht mehr.

Das Plasmid pPF3/V1 del2-15, das eine große Deletion aufwies, die an der Eco RI Schnittstelle von pPF3/V1 begann und unmittelbar hinter der nächsten Pst I Schnittstelle des großen 3,5 Md Pst I Fragments mit *fhuA*, *fhuC* und *fhuD* endete (Abb. 12,b, Deletion I), codierte nicht mehr für das 26 K Protein. Minizellen mit pPF3/V1 del2-15 synthetisierten dagegen ein kleineres 24 K Protein, das von Minizellen mit pPF3/V1 nicht synthetisiert wurde. Dieses 24 K Protein, das in geringeren Mengen als das 26 K Protein gebildet wurde, stellte ein unvollständig synthetisiertes 26 K Protein dar.

Besonders gut sichtbar wurde das 26 K und das 24 K Protein im Fluorogramm der Proteinauftrennungen von Minizellen mit pPF3/V1/SV2 und pPF3/V1 del2-15/SV2, die wegen der Deletion des 1,65 Md Sal I Fragments nicht mehr FhuA synthetisierten (3.3.1.2.1.). Das Auftreten des 24 K Proteins bei Minizellen mit pPF3/V1 del2-15 konnte nur dann erklärt werden, wenn dieses Protein beginnend an einer Sal I Schnittstelle im 3,5 Md großen Pst I Fragment in gleicher Richtung wie *fhuA* transkribiert wurde (Abb. 22). Zusammen mit den Ergebnissen mit pFB101 und pFB102 war die Transkriptionsrichtung des Gens *fhuD* für das 26 K Protein und seine Lage im 3,5 Md Pst I Fragment zwischen einer Sal I und Pst I Schnittstelle bestimmt (Abb. 22).

Neben fhuA und fhuC ist das 26 K FhuD Protein vermutlich als Bestandteil der Cytoplasmamembran (3.3.2.1.) auch für die Wirkung von Albomycin auf die Zelle und für die Aufnahme von Fe(III) mit Ferrichrom und Rhodothorulasäure (fhuA unabhängige Aufnahme) notwendig. HB101 fhuA13, mit der über fhuA hinausgehenden Mutation (3.1.1.), wurde weder von pFB101 noch von pFB102 zur Albomycin Sensitivität oder zum Wachstum mit Ferrichrom komplementiert. Außerdem wurde unter 23 selektionierten Albomycin resistenten Mutanten, die durch Komplementation untersucht wurden, die Mutante H416 Ar4'1/2 gefunden (3.2.2.), die zwar noch mit Plasmiden mit Tn5 Insertionen in fhuC und fhuA aber nicht mehr mit Plasmiden mit Tn5 Insertionen in fhuD und fhuB komplementiert wurde. Da jedoch zahlreiche fhuD$^+$ fhuB$^-$ Mutanten auftraten, stellt fhuD als Komplementationseinheit ein eigenes Gen dar.

Im Gegensatz zu fhuA und fhuC konnte in Minizellen keine erhöhte Expression von fhuD und somit des FhuD Proteins bei Eisenmangel nachgewiesen werden. Wenn man die Menge an DNS, die für die Codierung des 26 K FhuD Proteins notwendig ist, genauso wie die von FhuA oder FhuC berechnet, dann kommt man auf 0,5 Md lineare Doppelstrang-DNS. Es ist möglich, daß fhuD innerhalb des Fragments, das durch die Sal I und Pst I Schnittstelle abgegrenzt ist, enthalten ist. Es kann sich aber auch ein kleines Stück in das benachbarte 0,93 Md Pst I Fragment erstrecken (Abb. 22).

4.5. Lokalisierung von fhuB

Bei der Untersuchung von 23 nach Albomycin Resistenz selektionierten Spontanmutanten der Stämme H416 und H506 r$^-$m$^-$(1) fepA1/2 durch Komplementation mit verschiedenen Plasmiden wurde bei 6 Mutanten, die T5 sensitiv waren aber nicht mehr mit Ferrichrom und Rhodothorulasäure wuchsen, der Ort der Mutation distal von fhuA im 0,93 Md Pst I Fragment lokalisiert (Abb. 22). Diese Mutationen wurden als fhuB Mutanten bezeichnet. Sie traten häufiger auf als fhuC und fhuD fhuB Mutanten, von denen jeweils

nur eine gefunden wurde. Die Tn*5* Insertionsplasmide pFB1 und pFB2 (Abb. 8) mit Tn*5* Insertionen im 0,93 Md Pst I Fragment, sowie Deletionsplasmide mit Deletionen in einem Bereich, der sich über das 0,93 Md Pst I bis weitestens zur benachbarten Cla I Schnittstelle erstrekkte, konnten diese *fhuB* Mutanten nicht mehr zur Albomycin Sensitivität und zum Wachstum mit den Hydroxamsäure Siderophoren komplementieren. Außerdem komplementierten diese Mutanten H416 *fhuA*13 nur zur T5 Sensitivität (3.2.2., 3.2.4.).

Die Komplementation durch die *fhuB*$^+$ Plasmide pPF3/V1/SV3, bei dem die 1,65 Md und 1,25 Md Sal I Fragmente (Abb. 22) im Vergleich zu pPF3/V1 fehlten, und pPF3/V1/PV2, dem das 3,5 Md Pst I Fragment (Abb. 22) fehlte, fiel im Gegensatz zu allen anderen *fhuB*$^+$ Plasmiden, die gut komplementierten, unterschiedlich aus. Während pPF3/V1/SV3 alle *fhuB* Mutanten nur zur partiellen Albomycin Sensitivität und zum schwachen Wachstum mit Ferrichrom komplementierte, zeigte pPF3/V1/PV2 eine so gute Komplementation wie pPF3/V1 oder pPF3/V2. Das kleine 0,45 Md Pst I - Sal I Fragment, das bei pPF3/V1/SV3 dem 0,93 Md Pst I Fragment im Gegensatz zu pPF3/V1/PV2 vorgeschaltet ist und das für *fhuD* codiert, scheint also bei pPF3/V1/SV3 die Expression von *fhuB* zu beeinträchtigen.

In Minizellen mit *fhuB*$^+$ und *fhuB*$^-$ Plasmiden konnte in keinem Fall ein Protein nachgewiesen werden, das dem *fhuB* Gen zuzuordnen wäre (3.3.1.2.2.). Es konnte jedoch die Verringerung der Plasmid abhängigen Expression von *fhuA*, *fhuC* und *fhuD* bei Plasmiden mit Deletionen in *fhuB* gezeigt werden. Es ist unbekannt ob diese veränderte Expression eine wirkliche vielleicht regulatorische Funktion von *fhuB* darstellte, oder ob sie auf die Veränderung in den Plasmiden, die zum Ausfall von *fhuB* führten, zurückzuführen waren.

fhuB Mutanten konnten durch pPF3/V1 und pCF1/V1 Abköm-

mlinge, die in einem etwa 0,9 bis 1,4 Md großen DNS Abschnitt an verschiedenen Stellen verändert waren, nicht mehr komplementiert werden. Dies zeigte, daß es sich bei den fhuB Mutationen tatsächlich um Veränderungen handelte, die nur eine Transkriptionseinheit betrafen. Nach der minimalen beziehungsweise maximalen Größe des fhuB DNS Abschnitts ist für das fhuB Genprodukt eine Größe von 50 K bis etwa 80 K anzunehmen. Das fhuB Genprodukt könnte neben FhuC und FhuD die dritte Komponente des für Hydroxamsäure-Siderophore spezifischen Fe(III)-Aufnahmesystems in der Cytoplasmamembran darstellen.

4.6. Komplementationsversuche

Bei der Lokalisierung der Mutationen, die zur Albomycin Resistenz bei H416 und H506 r^-m^-(1) fepA1/2 führten, konnten neben den bereits besprochenen Mutationen in fhuB, fhuC und fhuD fhuB durch Komplementationsversuche noch zahlreiche Mutationen lokalisiert werden, die alle in irgend einer Weise fhuA betrafen und sich verschieden auswirkten (3.2.2., 3.2.4.). So konnten zusätzlich T5 resistente fhuA Mutanten, die auch nicht mehr mit Ferrichrom und Rhodothorulasäure wuchsen, zum Beispiel nur dann zum Wachstum mit Rhodothorulasäure, das FhuA nicht als Rezeptorprotein benötigt, komplementiert werden, wenn die transformierten Plasmide fhuC, fhuD und fhuB intakt enthielten. Da eine gute Komplementation zum Wachstum mit Ferrichrom bei den meisten Mutanten auch nur dann erfolgte, wenn diese Gene alle intakt auf den Plasmiden vorhanden waren, ist eine gute Aufnahme dieser Siderophore auch von einem ausgewogenem Verhältnis dieser Genprodukte abhängig. Diese Mutationen in fhuA hatten entweder den Ausfall des gesamten FhuA Proteins zur Folge oder sie betrafen eine Region des FhuA Rezeptorproteins, die sowohl als Phagenbindungsstelle als auch zur Anlagerung von Ferrichrom und Albomycin notwendig war (37). Wahrscheinlich verursachte diese Mutation wegen der Auswirkung auf das Wachstum mit Rhodothorulasäure eine verringerte Expression

der Gene fhuC, fhuD und fhuB (42a)

Es wurden Albomycin resistente Mutanten von H416 und H506 r^-m^- fepA1/2 gefunden, die noch T5 sensitiv waren und die nur noch ein schlechtes Wachstum mit Ferrichrom zeigten. Auch diese Mutanten konnten mit Plasmiden mit intaktem fhuA zur Albomycin Sensitivität und zum Wachstum mit Ferrichrom komplementiert werden. Eine Komplementation zum Wachstum mit Rhodothorulasäure war bei diesen Mutanten wieder nur mit Plasmiden mit intaktem fhuB, fhuC und fhuD möglich. Wie im vorigen Fall scheint auch hier die Mutation in fhuA im Bakterienchromosom einen polaren Effekt auf die Expression dieser Gene auszuüben (42a). Die restliche Expression dieser Gene erlaubte jedoch nur eine schwache Verwertung von Ferrichrom.

Die Albomycin resistente und T5 sensitive Mutante H416 Ar2/2 (3.2.2.) wuchs mittels Ferrichrom und Rhodothorulasäure zur Eisenversorgung wie der Wildtyp H416. Diese Mutante konnte jedoch auch Fe(III), das in Albomycin komplexiert war, verwerten. Eine partielle Komplementation zur Albomycin Sensitivität war nur mit den Plasmiden pPF3/V1 und pCF1/V1 möglich, welche die gesamte fhu Region intakt enthielten. Von 16 untersuchten Albomycin resistenten Mutanten des Stamms H506 r^-m^-(1) fepA1/2 (3.2.4.) zeigten 5 einen ähnlichen Phänotyp wie H416 Ar2/2. Bei diesen Mutanten genügten jedoch zur Komplementation zur partiellen Albomycin Sensitivität Plasmide, bei denen mindestens fhuA und fhuB intakt waren. Wegen der meistens nicht vollständigen Komplementationen dieser Mutanten zur Albomycin Sensitivität ist es nicht sicher, daß der Ort der Mutation zur Albomycin Resistenz wirklich in der fhu Region liegt. Tatsächlich konnte später gezeigt werden (11a), daß bei diesen Mutanten das Gen pepN betroffen war, das eine Peptidase codiert, die wesentlich an der Abspaltung der antibiotisch wirksamen Albomycin-Seitengruppe beteiligt ist (11a).Diese pepN Mutationen wurden aber durch einen Überschuß der Plasmid codierten

Gene fhuA, fhuC, fhuD und fhuB auf Grund eines Gen-Dosis Effekts supprimiert.

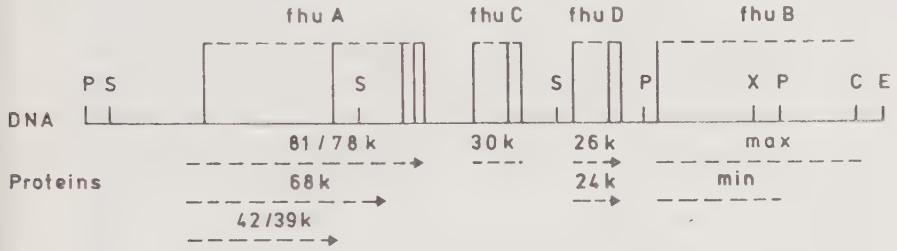


Abb. 22: Chromosomales DNS Insertionsfragment mit der fhuA, fhuC, fhuD, fhuB Region des Plasmids pPF3/V1, das bei diesem Plasmid in der Ampicillin Resistenzregion von pBR322 enthalten ist. Das Plasmid pCF1/V1 enthält das etwas kleinere analoge Insertionsfragment in der Tetracyclinresistenzregion von pBR322. Größe der Restriktionsfragmente (von links nach rechts): 3,5 Md Pst I Fragment, welches das 1,65 Md Sal I und das 1,25 Md Sal I Fragment enthält; 0,93 Md Pst I Fragment; 0,5 Md Pst I - Cla I Fragment beziehungsweise 0,65 Md Pst I Eco RI Fragment. Die Gene fhuA, fhuC, fhuD und fhuB wurden nach den Orten der äußersten Tn5 Insertionen (senkrechte Linien), welche diese Gene inaktivieren, abgegrenzt. Die maximale oder minimale Ausdehnung von fhuB konnte in Komplementationsversuchen mit Deletionsplasmiden festgestellt werden. Die gestrichelten waagrechten Linie bezeichnen die für die verschiedenen Gene im Minizellsystem nachgewiesenen Genprodukte beziehungsweise die bei manchen Plasmidvarianten nur partiell synthetisierten Genprodukte. Die Pfeile zeigen die Richtung der Transkription der Gene fhuA und fhuB. C, E, P, S und X stehen für die spezifischen DNS Erkennungsstrukturen für die Restriktionsenzyme Cla I, Eco RI, Pst I, Sal I und Xho I.

5. Zusammenfassung

Ausgehend vom Plasmid pLC4-43 der Clarke und Carbon Genbank des E. coli K12 Chromosoms wurde die in diesem Plasmid enthaltene fhuA (tonA), fhuB Region in die Ampicillin-Resistenzregion beziehungsweise in die Tetracyclin-Resistenzregion von pBR322 integriert. Die selektionierten Plasmide pPF3 (Integration in die Pst I Schnittstelle von pBR322) und pCF1 (Integration in die Cla I Schnittstelle von pBR322) und deren direkten Verkleinerungsformen pPF3/V1 und pCF1/V1 komplementierten alle chromosomalen Mutationen in fhuA oder in seiner Nachbarschaft, die zur Albomycin Resistenz führten und die bewirkten, daß diese Mutanten sich nicht mehr über Ferrichrom und Rhodothorulasäure mit Eisen(III) versorgen konnten.

Komplementationsversuche von Albomycin-resistenten Spontanmutanten mit Tn5 Insertionsplasmiden und Deletionsplasmiden von pCF1, pCF1/V1, pPF3 und pPF3/V1 zeigten, daß neben fhuA noch mindestens drei Genorte liegen, nämlich fhuC, fhuD und fhuB, die alle für die Aufnahme von Fe(III) mit den untersuchten Hydroxamsäure-Siderophoren notwendig waren. Diese Gene wurden auf der physikalischen Karte der entsprechenden DNS Region kartiert.

Bei der Untersuchung der Expression der Plasmid-codierten Gene im Minizellsystem konnte dem Gen fhuA das bereits bekannte 78 K Protein mit seiner Proform, einem 81 K Protein, zugeordnet werden. Neben fhuA codierte fhuC für ein 30 K Protein und schließlich fhuD für ein 26 K Protein. Im Maxizellsystem konnte das 30 K Protein als Bestandteil der Cytoplasmamembran nachgewiesen werden. Die Expression dieser Gene in den Minizellen nahm von fhuA, fhuC bis fhuD ab. Für das fhuD benachbarte fhuB konnte kein Genprodukt nachgewiesen werden. Ein negativer Effekt von Plasmiden mit Deletionen in fhuB auf die Expression der Gene fhuA, fhuC und fhuD auf den gleichen Plasmiden konnte gezeigt werden.

Das Auftreten von unvollständig synthetisierten FhuA und FhuD Proteinen bei Tn*5* Insertionsplasmiden und einem Deletionsplasmid ermöglichte die Bestimmung der Transkriptionsrichtung dieser Proteine. Sie ist bei diesen Genen identisch und erfolgt in einer Richtung, die von *fhuA* nach *fhuB* weist; außerdem verläuft sie im Uhrzeigersinn der *E. coli* K12 Genkarte (26).

6. Literatur

1. Aaij, C., Borst, P., 1972, Biochim. Biophys. Acta, 269, 192 - 201.

2. Bachman,B.J., Low,K.B., 1980, Bacteriol. Rev.,44, 1-56.

3. Bendiak, D.S., Friesen, J.D., 1981, Mol. Gen. Genet., 181, 356 - 362.

3a. Benz, G., Schröder, T., Kurz, J., Wünsche, C., Karl, W., Steffens, G., Pfitzner, J., Schmidt, D., 1982, Angew. Chem. Suppl., 1322 - 1335.

4. Berg, D.E., in DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes, 1977,Cold Spring Harbour Laboratory, 205-212.

5. Birnboim, H.C., Doly, J., 1979, Nucleic Acids Research, 7, 1513 - 1523.

6. Bolivar,F., in: Molecular Cloning Vectors: Derivatives of Plasmid pBR322, in: Genetic Engineering, Boyer, H.W., Nicosia, S.(Eds.), 1978, Elsevier, North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, 59 - 63.

7. Bolivar, S., Rodriguez, R.L., Green, P.J., Betlach,M. Heyneker, H.L., Boyer, H.W., 1977, Gene, 2, 95 - 113.

8. Braun, V.,1975, Biochim. Biophys. Acta, 415, 335 - 377.

9. Braun, V., 1978, Structure-function relationships of gram-negative bacterial cell envelope, in: Relations between Structure and Function in the Prokaryotic Cell (R.Y. Stanier, H.J. Rogers, and B.J. Wards, Eds.), Cambridge University Press, 111 - 138.

10. Braun, V., 1981, FEMS Microbiol. Lett., 11, 225 - 228.

11. Braun, V., 1983, The Iron Transport Systems of Escherichia coli, in: The Enzymes of Biological Membranes, A.N. Martonosi (Ed.), Plenum Press, New York.

11a. Braun, V., persönliche Mitteilung.

12. Braun,V., Burkhardt, R., 1982, J. Bacteriol., 152, 223 - 231.

13. Braun, V., Burkhardt, R., Schneider, R., Zimmermann, L., 1982, J. Bacteriol., 151, 553 -559.

14. Braun, V., Hantke, K., 1977, Bacterial receptors for phages and colicins as constituents of specific tranport systems, in: Microbial Interactions (Receptors and Recognition, Series B), Vol. 3 (J.L. Reissig,Ed) Chapman and Hall, London, 101 - 130.

15. Braun, V., Hantke, K., 1981, Bacterial cell surface receptors, in: Organization of Procaryotic Cell Membranes, Vol. II, (B.K. Ghosh, Ed.), CRC Press, Boca Raton, 1 - 74.

16. Braun, V., Hancock, R.E.W., Hantke, K., Hartmann, A., 1976, J. Supramol. Struct., 5, 37 -58.

17. Braun, V., Schaller, K., Wolff, H., 1973, Biochim. Biophys. Acta, 323, 87 - 97.

18. Braun, V., Wolff, H., 1973, FEBS Lett., 34, 77 -80.

19. Brown, N.L., Smith, M., FEBS Lett., 1976, 65, 284 - 287.

20. Clarke, L., Carbon, J., 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 4361 - 4365.

21. Clarke, L., Carbon, J., 1976, Cell, 9, 91 - 99.

22. Clewell, D.B., 1972, J. Bacteriol., 110, 667 - 676.

23. Covey, C., Richardson, D., Carbon, J., 1976, Mol. Gen. Genet., 169, 49 - 57.

24. Dagert, M., Ehrlich, S.D., 1979, Gene, 6, 23 -28.

25. DiMasi, D.R., White, J.C., Schnaitman, C.A., Bradbeer, C., 1973, J. Bacteriol., 115, 506 - 513.

26. Diplomarbeit Lothar Fecker,1980, Mikrobiologie II, Tübingen.

27. Diplomarbeit Eleni Fecker, 1981, Mikrobiologie II, Tübingen.

28. Dissertation Klaus Günthner, 1983, Mikrobiologie II, Tübingen.

29. Dugaiczyc, A. Boyer, H.W., Goodman, H.M., 1975, J. Mol. Biol., 96, 171 - 184.

30. Frost, G.E., Rosenberg, H., 1973, Biochim. Biophys. Acta., 330, 90 - 101.

31. Glover, S.W., 1970, Genet. Res.,15, 237 - 250.

32. Hantke, K., 1976, FEBS Lett., 70, 109 - 112.

33. Hantke, K., 1981, Mol. Gen. Genet., 182, 288 - 292.

34. Hantke, K., 1982, FEMS Microbiol. Lett., 15, 83 - 86.

35. Hantke, K., Mikrobiologie II, Universität Tübingen, persönliche Mitteilung.

36. Hantke, K., Braun, V.,1975, FEBS Lett., 49, 301.

37. Hantke, K., Braun, V.,1978,J. Bacteriol.,135,190-197.

38. Hantke, K., Zimmermann, L., 1981, FEMS Microbiol. Lett., 13, 31 - 35.

39. Hartmann, A., Braun, V., 1980, J. Bacteriol.,143, 246 - 255.

40. Hartmann, A., Fiedler, H.P., Braun, V., 1979, Eur. J. Biochem., 99, 517 - 524.

41. Kadner, R.J., Heller, K., Coulton, J.W., Braun, V., 1980, J. Bacteriol., 143, 256 - 264.

42. Keith, R., Yamamoto, Bruce, M., 1970, Virol., 40, 737 -744.

42a. Köster, W., Diplomarbeit 1983,Mikrobiologie II, Universität Tübingen.

43. Konisky, J., 1978, The Bacteriocins, in: The Bacteria (L.N. Ornston, J.R. Sokatch (Eds.)), The Bacteria, Vol 6,Bacterial Diversity, Academic Press, Inc., New York.

44. Krieger-Brauer,H.J., Braun,V.,1980, Arch. Microbiol., 114, 233 - 242.

45. Levy, S.B., 1975, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 72, 2900 - 2904.

46. Luckey, M., Pollack, J.R., Wayne,R., Ames, B.N., Neilands, J.B., 1972, J. Bacteriol., 110, 667 - 676.

47. Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., Hoek, P., A.v.d.A ,L., 1975, FEBS Lett., 58, 254 - 258.

48. Mayer, H., Grosschedl, R., Schütte, H., Hobom, G., 1981, Nucleic Acids Research, 19, 4833 - 4845.

49. Martonosi, A.N. (Ed.), 1982, Membranes and Transport, Plenum Press, New York, London.

50. McIntosh, M.A., Chenault, S.S., Earhart, C.F., 1979, J. Bacteriol., 137, 653 - 657.

51. Michaelis, S., Beckwith, J., 1982, Ann. Rev. Genet., 36, 435 - 465.

52. Neilands, J.B., Ann. Rev. Biochem., 1981, 50, 717 - 731.

53. Nikaido, H., Nakae, T., 1979, The outer membrane of gram-negative bacteria, in: Advances in Microbial Physiology, Vol. 20 (A.H. Rose and J.G. Morris, Eds.), Academic Press, London, 163 - 250.

54. Ørskov, I., Ørskov, F., Jann, B., Jann, K., 1977, Bacteriol. Rev.,41, 667 - 710.

55. Phillipsen et. al., 1978, J. Mol. Biol., 123, 371 - 386.

56. Piechaczyk, M., Jeanteur, P., Louarn, J.M., 1980, Gene, 11, 173 - 175.

57. Plastow, G.S., Pratt, J.M., Holland, J.B., 1981, FEBS Lett., 131, 262 - 264.

58. Polisky, B., Green, P., Garfin, D.E., McCarthy, B.J., Goodman, H.M., Boyer, H.W., 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 3310 - 3314.

59. Pugsley, A.P., Reeves, P. 1976, J. Bacteriol. 127, 218 - 228.

60. Pugsley, A.P., Reeves, P., 1977, Biochem. Biophys. Res. Commun., 74, 903 - 911.

61. Radloff, R., Bauer, W., Vinograd, J., 1967, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 57, 1514 -1521.

62. Reynolds, P.R., Mottur, G.P., Bradbeer, C., 1980, J. Biol. Chem. , 255, 4314 - 4319.

63. Rodriguez, R.L., West, R.W., Heyneker, H.L., 1979, Nucl. Acids. Res. 6, 3267 -3284.

64. Roozen, K.J., Fenwick, R.G., Curtiss, R. 1971, J. Bacteriol., , 21 - 33.

65, Rosenberg, H., Young, J.G., 1974, Iron transport in the enteric bacteria, in: Neilands, J.B. (Ed.): Microbial Iron Metabolism -A Comprehensive Treatise, Academic Press, New York, 1974, 67 -81.

66. Rothstein, S.J., Jorgensen, R.A., Postle, K., Reznikoff, W.S., 1980, Cell, 19, 795 -805.

67. Sancar, A., Hack, A.M., Rupp, W.D., 1978, J. Bacteriol., 137, 692 - 693.

68. Schleifer, K.H., Kandler, O., 1972, Bacteriol. Rev., 36, 407 - 477.

69. Schnaitman, C., 1971, J. Bacteriol., 108, 545 - 552.

70. Schneider, R., Hartmann, A., Braun, V., 1981, FEMS Microbiol. Lett., 115 - 119.

71. Schweizer, M., Henning, U., 1977, J. Bacteriol., 129, 1651 - 1652.

72. Sutcliffe, J.G., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3737 - 3741.

73. Szmelcman, S., Hofnung, M. 1975, J. Bacteriol., 124, 112 - 118.

74. Szmelcman, S., Schwartz, M., Silhavy, T.I., Boos, W., 1976, Eur. J. Biochem., 65, 13 - 19.

75. Takeda, Y., Nishimura, A., Hirota, Y. et al., 1981, Plasmids, 6, 86 - 98.

76. Thompson, R., Achtman, M., 1979, Mol. Gen. Genet., 169, 49 - 57.

77. Tikchonenko, T.I., Karamov, E.V., Zavizion, B.A., Naroditzky, B.S., 1978, Gene, 4, 195 - 212.

78. Wagegg, W., Braun, V., J. Bacteriol., 145, 156 - 163.

79. Warner, P.J., Williams, P.H., Bindereif, A., Neilands, J., 1981, Infect. Immun., 33, 540 - 545.

80. Wayne, R., Neilands, J., 1975, J. Bacteriol., 121, 497 - 503.

81. Weiss, B., Richardson, Ch.C., 1967, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 57, 1021 - 1028.

82. Williams, P.H., Warner, P.J., 1980, Infect. Immun., 29, 411 - 416.

83. Wookey, P.J., Rosenberg, H., 1978, J. Bacteriol., 133 661 - 666.

83a. Wookey, P.J., Hussein, S., Braun, V., 1981, J. Bacteriol., 146, 1158 - 1161.

84. Young, I.G., Langman, L., Luke, R.K.J., Gibson, F., 1971, J. Bacteriol., 106, 51 - 57.

Plasmidkonstruktionen

pLC4-43 (Abb. 4)

Integration in Pst I Schnittstelle von pBR322

pPF3 (Abb. 4, Abb. 7)

Insertion: PS S S P XP CE S P

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 [Md]

Sal I Deletionsplasmide:

pPF3/SV2 (Δ0,15-1,8 Md)
pPF3/SV3 (Δ0,15-3,05 Md)
pPF3/SV1 (Δ3,05-6,33 Md)
(siehe Abb. 13, a)

fhuA::Tn*5* Insertionsplasmide:

pTN1 (Tn*5* Insertion bei 2,08 Md)

Pst I Deletionsplasmide:

pPF3/PV2 (Δ0-3,5 Md)
pPF3/PV3 (Δ0-4,43 Md)
pPF3/PV4-1 (Δ4,43-8,93 Md)
pPF3/PV5 (Δ3,5-8,93 Md)
(siehe Abb. 14, d)

Integration in Cla I Schnittstelle von pBR322

pCF1 (Abb. 4, Abb. 7)

C P P PS S P XP C

-4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 [Md]

(Abkömmlinge siehe übernächste Seite)

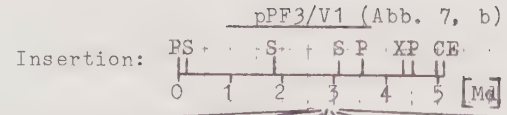
Eco RI Deletionsplasmid (Deletion bis zur Eco RI Schnittstelle von pBR322):

pPF3/V1 (Abb. 7, b)

Insertion: PS S S P XP CE

0 1 2 3 4 5 [Md]

(Abkömmlinge siehe nächste Seite)



Sal I Deletions-plasmide:

pPF3/V1/SV2 (Δ0,15-1,8 Md)

pPF3/V1/SV3 (Δ0,15-3,05 Md)

(siehe Abb. 14, a)

Pst I Deletions-plasmide:

pPF3/V1/PV2 (Δ0-3,5 Md)

pPF3/V1/PV1 (Δ3,5-4,43 Md)

pPF3/V1/PV3 (Δ0-4,43 Md)

(siehe Abb. 14, c)

Eco RI* Deletions-plasmide:

pPF3/V1 del2-9 (Δ1,7-5,08 Md)

pPF3/V1Δdel2-15 (3,48-5,08 Md)

(siehe Abb. 12, b)

Tn*5* Insertions-plasmide:

fhuA::Tn*5* bei pTN2 (Insertionsstelle: 2,12 Md)

und bei pTN3** (Insertionsort: 2,08 Md)

fhuC::Tn*5* bei pFB103 (Insertionsstelle: 2,45 Md)

und pFB505 (Insertionsort: 2,7 Md)

fhuD::Tn*5* bei pFB101** (Insertionsort: 3,25 Md)

und pFB102**(Insertionsort:3,4 Md)

(siehe Abb. 8 und Abb. 12)

Deletionsplasmide-Transformation mit Xho I linearisierter Plasmid DNS:

	Deletionsgröße um Xho I Schnittstelle
pXC17	0,05 Md
pXC21	0,05 Md
pXC11	0,12 Md
pXC37	0,95 Md

(siehe Abb. 12, a)

Deletionsplasmide nach Xho I - Sau 3a Doppelverdau:

	Größe der Deletion
pPF3/V1 del6-10	0,65 Md
pPF3/V1 del06-2	2,8 Md
pPF3/V1 del06-3	3,6 Md
pPF3/V1 del6-4	4,15 Md
pPF3/V1 del4-1	4,55 Md
pPF3/V1 del6-6*	3,0 Md
pPF3/V1 del 6-11*	3,05 Md

(siehe Abb. 12, c)

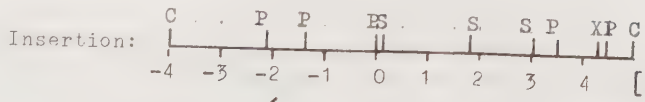
Sal I Deletionen:

pPF3/V1 del2-15/SV2 (Δ0,15-1,8 Md)

pPF3/V1 del2-15/SV3 (Δ0,15-3,05 Md)

(siehe Abb. 14, b)

pCF1 (Abb. 4, Abb. 7, c)



Sal I Deletionsplasmide

(Sal I Deletionen bis zur Sal I Schnittstelle in pBR322)

pCF1/V2 (ΔSal I von pBR322 bis 1,8 Md)

pCF1/V3 (ΔSal I von pBR322 bis 2,05 Md)

(siehe Abb. 7, e und f)

pCF1/V1 (ΔSal I von pBR322 bis 0,15 Md)

Tn*5* Insertionsplasmide (siehe Abb. 8)

fhuA::Tn*5*: pTN7, pTN9, pTN10 (Insertionsstelle bei 2,07 Md) und pTN8 (Insertionsstelle bei 2,2 Md)

Tn*5* Insertionsplasmide (siehe Abb. 8)

fhuA::Tn*5* bei pTN4 (Insertion bei 0,66 bis 0,9 Md) und pTN5** (Insertionsort bei 1,77 Md)

fhuC::Tn*5* bei pFB5** (Insertionsort: 2,69 Md) und pFB7 (Insertionsort: 2,76 Md)

fhuB::Tn*5* bei pFB1** (insertionsort: 3,61 Md)

Tn*5* Insertion vermutlich zwischen *fhuC* und *fhuD* bei pFB3** (Insertion bei 3,12 Md)

Erläuterungen: *: Die Deletion betrifft hier nicht die Xho I Schnittstelle im 0,93 Md Pst I Fragment. **: von diesen Plasmiden wurden zusätzlich noch Xho I Deletionsplasmide isoliert (sieh Abb. 10).

LEBENSLAUF

	Lothar Friedrich Fecker geboren am 1. November 1954 in Balingen
1961 - 1965	Besuch der Volksschule in Bisingen, Zollernalbkreis
1965 - 1973	Besuch des Staatlichen Gymnasiums in Hechingen
25. 6.1973	Reifezeugnis
1973, 1974	Wehrdienst und Zivildienst
ab Wintersemester 1974	Studium der Biologie, Diplom an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
22. 10.1976	Zeugnis der Diplomvorprüfung
13. 3.1980	Zeugnis der Diplomhauptprüfung in Biologie, Hauptfach Mikrobiologie. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie II, Universität Tübingen mit dem Titel: Versuche zur Klonierung der fhuA (tonA) Region von Escherichia coli.
Sommersemester 1980 bis Sommersemester 1983	Anfertigung der Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie II der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. V. Braun und Privatdozent Dr. K. Hantke

Meine akademischen Lehrer waren
K. Altendorf, D. Ammermann, C.F. Bardele, F.W. Bentrup, W.U. Berthold, W. Bessler, H. Biessmann, V. Braun, D. Bunke, W. Busch, U. Feine, W. Frey, D. Gradmann, K.G. Grell, J. Guglielmi, K.P. Hadeler, A. Hager, K. Hantke, V. Hemleben, E. Kallee, O. Klee, W. Löffler, H. Meier, W. Nakel, F. Oberwinkler, C. Pelling, W. Rähle, A. Rieker, E. Sander, B. Schwemmle, H. Seiler, U. Seitz, W. Seyffert, J. Strähle, H. Tichy, G. Weitzel, G. Winkelmann, K. Wöhrmann, H. Zähner.